

# ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

## L'ÉPITHÉLIOMA INTRACUTANÉ DU LAPIN ET SON POUVOIR IMMUNISANT

Par A. BESREDKA, I. MAGAT, P. LAVAL et P. BESNARD.

Les faits décrits chez la souris sarcomateuse (1) se retrouvent-ils chez d'autres animaux auxquels on inocule des tumeurs malignes?

Les expériences qui font l'objet du présent article, portent sur l'épithélioma du lapin, tumeur particulièrement maligne, que nous connaissons depuis les belles recherches de Pearce et Brown (2). Ces savants, qui avaient essayé les diverses voies d'inoculation, ont constaté que c'est la voie intratesticulaire qui est la plus fidèle et qui donne dans presque tous les cas des métastases mortelles. Les caractères cliniques et anatomo pathologiques de cette tumeur ont été décrits avec tous les détails par les auteurs américains; aussi jugeons-nous inutile de nous y arrêter longuement. Notons seulement qu'à l'autopsie des lapins inoculés dans les testicules, on est frappé de l'intensité et de la dissémination des lésions. Les organes les plus atteints sont les reins, les capsules surrénales, le foie, les ganglions mésentériques, la face inférieure du diaphragme, la vessie, les poumons (fig. 1). Fait remarquable, quel que soit le

(1) *C. R. de l'Académie des Sciences*, 200, p. 175, 793, 1550; *Ces Annales*, 55, octobre et novembre 1935.

(2) *Journal of Experim. Medic.*, 38, 1923, p. 347, 367, 385, 601, 631, 799, 814; *Proceed. Soc. Experim. Biol. a. Medic.*, 20, 1923, p. 472; 21, 1924, p. 371.

degré d'envahissement des organes, la rate reste presque toujours indemne.

A en juger par la durée de la période d'incubation et par l'étendue des lésions dans nos différentes expériences, on est porté à croire que la virulence de l'épithélioma est susceptible de varier dans une assez large mesure. Ainsi, dans certains cas les premières manifestations d'orchite apparaissent seulement trois à quatre semaines après l'inoculation ; mais, le plus souvent, c'est dans les huit à dix jours que les testicules commencent à s'hypertrophier et à durcir. Nous avons aussi observé des lapins chez lesquels, dans les quinze jours qui suivirent l'inoculation dans les testicules, des tumeurs métastatiques étaient déjà en voie de dégénérescence. Aussi, est-il indiqué, pour ne pas risquer de perdre la souche, de procéder à des passages rapprochés.

Le pourcentage des inoculations intratesticulaires positives a pu être évalué, dans la plupart de nos expériences, à 90-95 p. 100. Pour obtenir un tel résultat, certaines précautions sont à prendre, les unes relatives à la tumeur, d'autres à l'animal. Nous avons observé que l'apparition des tumeurs est d'autant plus fréquente et rapide que l'on s'adresse à des épithéliomas en pleine évolution, de préférence à des métastases, et que l'on évite des tissus en voie de ramollissement. On choisira des lapins ayant des testicules bien développés et on aura soin de porter le produit à inoculer directement dans la masse glandulaire.

Voici la technique que nous avons adoptée ; elle se rapproche de celle déjà décrite au sujet du sarcome et diffère de celle couramment employée en ce que, au lieu d'insérer des fragments entiers de tumeur, nous injectons des émulsions aussi fines que possible.

La tumeur, coupée au ciseau en très petits morceaux, est triturée en présence de quelques gouttes d'eau physiologique dans un mortier ou introduite directement dans l'appareil de Fischer ou de Borrel, où elle est broyée et transformée en bouillie. Celle-ci est portée sur un tamis métallique, puis passée sur une toile à mailles très serrées. Après la filtration, on obtient une émulsion telle qu'elle peut passer sans difficulté à travers une aiguille de 7/10 et même 5/10 de millimètre.

L'avantage de cette technique est qu'elle permet, en raison



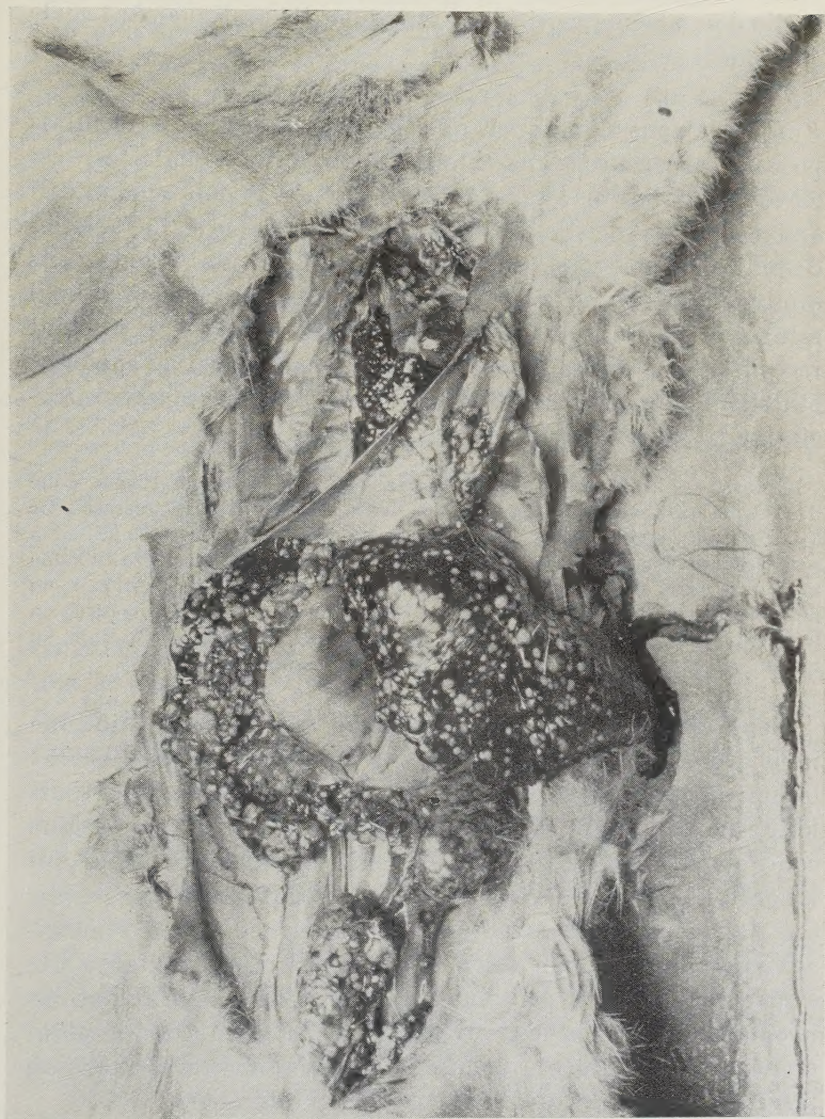


FIG. 1.

de l'homogénéité de l'émulsion, d'injecter à des animaux faisant partie d'une même expérience une quantité pratiquement égale de produit actif.

\*  
\* \*

Nous venons d'indiquer que le pourcentage des résultats positifs, consécutifs aux inoculations intratesticulaires, est élevé. Nous devons signaler à ce propos le fait suivant. Il arrive que les testicules, après avoir présenté les signes d'orchite néoplasique, subissent une régression rapide : ils diminuent de volume, redeviennent souples, si bien que l'animal semble complètement guéri. La guérison vraie est cependant rare ; le plus souvent, le retour à l'état normal n'est qu'apparent et il suffit de palper le ventre pour y constater des masses métastatiques. Voici l'histoire d'un de ces lapins.

Lapin A. — Le 21 juin, on inocule dans chaque testicule 1 cent. cube d'émulsion provenant d'un épithélioma des testicules et de métastases. Le 5 juillet, on constate deux gros testicules indurés. Ceux-ci se mettent à régresser rapidement, à partir du 10 juillet, au point d'être considérés comme revenus à l'état normal. Le 26 juillet, le lapin est sacrifié. A l'autopsie, on ne constate rien d'anormal à l'œil nu dans les testicules ; par contre, on trouve des métastases en très grand nombre dans la cavité péritonéale, au niveau du mésentère et à la face inférieure du diaphragme.

Nous assistons là à un phénomène qui rappelle celui que nous avons observé, avec Gross, chez les souris sarcomateuses : la tumeur développée à la place de l'inoculation régresse, puis finit par disparaître, cependant que le processus néoplasique continue son œuvre d'envahissement. Si bien que celui qui ignorait que l'animal avait été inoculé serait en droit de penser que des métastases peuvent prendre naissance sans être nécessairement liées à une lésion antérieure d'origine externe. Ne saurait-on admettre, par analogie, chez l'homme aussi, que des néoplasmes internes peuvent parfois reconnaître, comme point de départ, une tumeur superficielle, jugée sans importance ou résorbée sans avoir attiré l'attention de l'intéressé ?

\*  
\* \*

Au cours des recherches sur le sarcome de la souris, nous avons pu constater combien les résultats d'inoculation différaient suivant que cette dernière était faite sous la peau ou



dans la peau. Or, l'importance de la voie intracutanée ressort avec plus de netteté encore dans le cas d'épithélioma du lapin.

Voici, pour fixer les idées, l'histoire brièvement résumée du premier lapin auquel nous injectâmes des produits néoplasiques (1) [voir lapin B; fig. 2].

Lapin B. — Femelle. Le 6 avril, injection dans la peau du flanc, en cinq points, au total, 5 cent. cubes d'émulsion d'épithélioma.

Le 7 avril, 5 tuméfactions roses, limitées au niveau de chaque point d'inoculation.

9 avril, 5 nodules intracutanées; ils augmentent les jours suivants.

15 avril, chapelet de 5 tumeurs rouges, légèrement violacées, ayant l'aspect de 5 grosses cerises.

19 avril, état stationnaire.

26 avril, les tumeurs pâlissent, s'aplatissent et diminuent progressivement de volume.

30 avril, il ne reste, sur les 5 tumeurs, que 3 qui sont de dimensions d'une petite cerise et une quatrième, toute petite.

6 mai, 3 petites tumeurs pâles.

12 mai, 2 petites tumeurs.

23 mai, aucune trace de tumeurs; la peau est redevenue normale.

Il ressort de cette observation que l'épithélioma du lapin, inoculé *dans la peau*, donne lieu, après une période d'incubation de cinq jours environ, à des tumeurs intracutanées, évoluant progressivement pendant une dizaine de jours. Ces tumeurs, après être demeurées stationnaires pendant un temps qui est plus ou moins long suivant le cas, se mettent à régresser. Durant un mois environ, on assiste à ce processus d'involution: les tumeurs pâlissent, s'aplatissent et diminuent de plus en plus de volume jusqu'à ce qu'elles subissent une résorption intégrale.

Pour compléter l'histoire du lapin (B), faisons remarquer qu'il est mort d'une infection intercurrente, le 22 juillet, soit trois mois et demi après l'inoculation. A l'autopsie, il ne fut constaté aucune trace de métastases.

Notons que les injections d'épithélioma dans la peau offrent, entre autres, l'avantage de pouvoir être pratiquées indifféremment chez les lapins mâles ou femelles.

(1) Nous saisissons cette occasion pour exprimer au Dr Collier nos plus vifs remerciements de nous avoir envoyé de Berlin un lapin inoculé dans les testicules et ayant présenté, à l'autopsie, des métastases caractéristiques.

La particularité la plus importante des tumeurs épithéliomateuses *intracu anées* est que, jusqu'à présent, nous ne les avons jamais vues s'accompagner de métastases. Quelle que soit la dose de tumeur inoculée, que l'injection soit faite en un seul ou en plusieurs points, la peau semble opposer une barrière infranchissable à la généralisation. Sous ce rapport, l'étude de l'épithélioma du lapin offre un avantage très précieux sur celle du sarcome de la souris. En effet, quand on injecte une tumeur sarcomateuse à des souris dans la peau, avec l'intention de les conserver en vie, on ne prend jamais assez de précautions pour ne pas dépasser la dose utile, car dans bien des cas les métastases arrivent quand même et emportent l'animal. Rien de tel n'est à craindre dans le cas d'épithélioma du lapin lors des injections intracutanées : la tumeur qui se développe à la suite de ces injections reste toujours locale et finit toujours par se résorber en laissant l'animal en vie.

Une seule fois, au cours de nos nombreuses expériences, nous avons eu l'impression que l'épithélioma intracutané eut pour effet d'affecter l'état général de l'animal.

Il s'agissait d'un lapin auquel nous avions introduit antérieurement (26 juin) une dose massive (8 cent. cubes) d'émulsion de sarcome de la souris dans la peau du flanc, en huit points différents. Cette injection a été suivie d'infiltrations étendues qui se sont lentement résorbées. Quand la peau est revenue à son état normal, nous inoculâmes (13 septembre) à ce lapin, dans la peau, en trois points, une émulsion chargée (3 cent. cubes) d'épithélioma. Dans les cinq jours qui suivirent, nous vîmes apparaître trois tumeurs intracutanées, dont chacune atteignit rapidement le volume d'une noix. Dans la suite, ces trois tumeurs, en augmentant, ne formèrent qu'une seule tumeur confluyente. Le lapin avait beaucoup maigri et présentait une parésie des extrémités postérieures. Est-ce sous l'influence de sa grosse tumeur? Nous ne saurions l'affirmer. Nous avons décidé de le sacrifier (10 octobre). A l'autopsie, nous ne trouvâmes aucune infection, ni la moindre trace de métastases malgré l'énorme tumeur de la peau.

Faisons remarquer que, à l'exception de ce lapin inoculé dans des conditions spéciales, aucun de nos animaux inoculés dans la peau — nos expériences ont porté sur plusieurs centaines de lapins — n'a présenté de troubles généraux, ni au cours de l'évolution de l'épithélioma, ni après sa résorption.



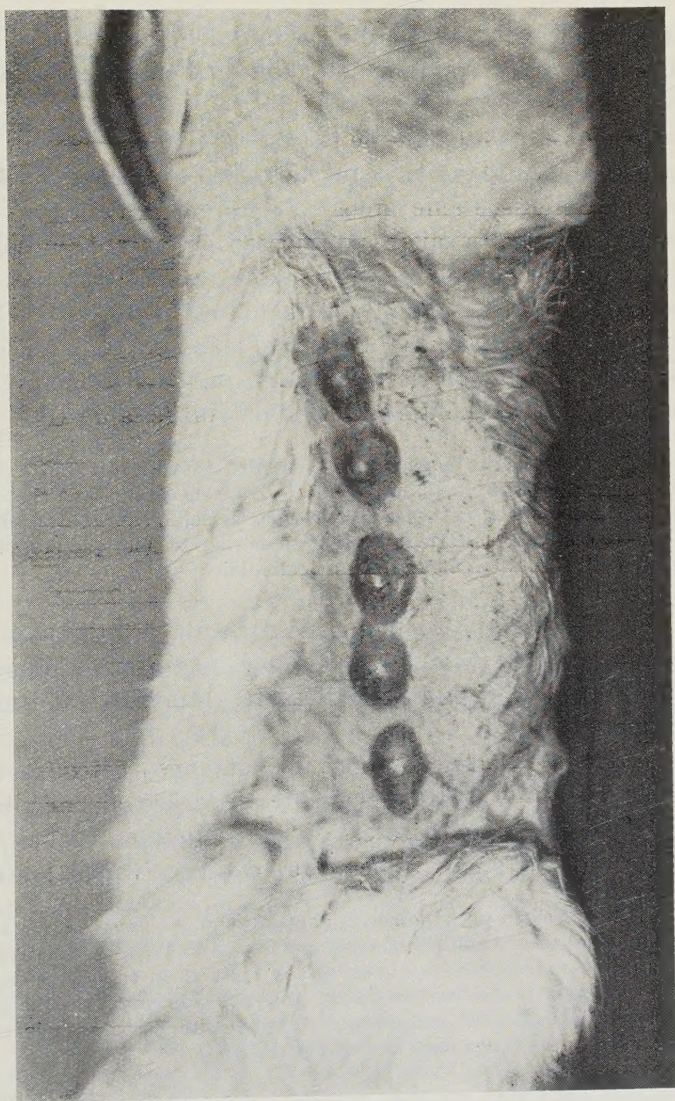


FIG. 2.

En présence du caractère si bénin de l'épithélioma intracutané, nous nous sommes demandé quelle pouvait en être la cause.

La *structure* histologique de la tumeur change-t-elle au cours de son évolution dans la peau? Les anatomo-pathologistes de compétence indiscutable nous déclarèrent qu'aucune différence ne saurait être saisie, au microscope, entre l'épithélioma intracutané et l'épithélioma testiculaire ou métastatique.

La *vitalité* de la tumeur intracutanée serait-elle éteinte lorsque cette dernière est enfermée dans la peau? Rien ne nous autorise à le supposer si l'on en juge par la facilité avec laquelle cette tumeur est réinoculable (voir le lapin C).

Lapin C. Des tumeurs intracutanées en pleine évolution sont excisées, broyées, puis injectées, le 20 avril, dans la peau du lapin C, en cinq points différents. Le 3 mai, on est en présence, chez ce lapin (C), de cinq tumeurs dont le développement ultérieur ne diffèrait en rien de celui que l'on observe à la suite de l'inoculation d'une tumeur testiculaire.

Il s'ensuit donc que les tumeurs intracutanées, bien qu'évoluant d'une façon absolument bénigne, possèdent une vitalité comparable à celle que présentent les tumeurs notoirement malignes.

La *virulence* de la tumeur intracutanée se trouve-t-elle modifiée au point d'être incapable de créer un néoplasme malin? Une telle hypothèse est en contradiction avec les faits. En voici un exemple entre beaucoup d'autres (voir le lapin D).

Lapin D. Le 21 avril, un lapin reçoit dans la peau, en deux points, 2 cent. cubes d'une émulsion d'épithélioma testiculaire. Le 28 avril, on constate deux tumeurs intracutanées. On les excise, on les broie et on en injecte dans les testicules du lapin D. Au bout de quinze jours, ce lapin présente une double orchite typique. Il est mort, un mois après, d'une épithéliomatose généralisée avec métastases multiples dans la cavité péritonéale.

Il en résulte donc que la tumeur intracutanée est bénigne tant qu'elle siège dans la peau; mais, dès qu'elle est transportée dans les testicules, cette même tumeur s'avère d'une virulence égale à celle d'une tumeur testiculaire ou métastatique.



Voici, dans le même ordre d'idées, quelques détails relatifs aux passages subis au cours de nos expériences par la tumeur initiale (origine Collier). Pour entretenir notre souche, nous avons employé indifféremment des tumeurs cutanées, testiculaires ou métastatiques, sans tenir compte de leur bénignité ou malignité :

Le 6 avril, le lapin 97 reçoit dans la peau la tumeur testiculaire (souche originelle Collier).

Le 26 avril, le lapin 4 reçoit dans les testicules la tumeur intracutanée du lapin 97.

Le 28 mai, le lapin 37 reçoit dans les testicules les métastases du lapin 4.

Le 21 juin, le lapin 72 reçoit dans la peau la tumeur testiculaire du lapin 37.

Le 28 juin, le lapin 81 reçoit dans les testicules la tumeur intracutanée du lapin 72.

Le 27 juillet, le lapin 99 reçoit dans les testicules la tumeur testiculaire du lapin 81.

Le 14 août, le lapin 16 reçoit dans les testicules la tumeur testiculaire du lapin 99.

Ce lapin (16) meurt le 4 septembre avec de nombreuses métastases dans les organes.

Les expériences que nous venons de rapporter montrent que ni la structure, ni la vitalité, ni la virulence ne subissent de changement appréciable lorsqu'on passe d'un épithélioma testiculaire à un épithélioma cutané et *vice versa*. Jusqu'à nouvel ordre, tout porte à croire que l'évolution de l'épithélioma du lapin vers la guérison ou vers la mort est subordonnée, en grande partie, à sa localisation.

En plus de la question de localisation, il existe des circonstances qui favorisent l'éclosion des métastases; tel est, par exemple, le cas des tumeurs intracutanées auxquelles on fait subir une opération sanglante (voir le lapin E).

Lapin E. Ce lapin était porteur de deux belles tumeurs intracutanées. Le 26 avril, on excise une de ces tumeurs, mais pas d'une façon radicale. Le 11 mai, on constate une récidive au niveau de l'opération. L' tat général laissant prévoir une issue fatale, on sacrifie l'animal le 31 mai.   l'autopsie, on trouve d'innombrables petites tumeurs dans les deux reins, le foie, les poumons et dans la cavité péritonéale. La rate est normale.

Nul doute que ce lapin, si on l'avait laissé à son propre sort, e t résorbé les deux tumeurs et survécu d'une façon définitive. Mais, l'intervention sanglante qu'il a subie et qui aurait dû à

*priori* lui prolonger la vie, la raccourcit d'une façon désastreuse; la tumeur bénigne, du fait de l'opération, devint maligne.

Notons que lorsque l'opération chirurgicale est radicale, qu'elle porte sur un épithélioma cutané ou même sur un épithélioma des testicules, elle se termine le plus souvent par la guérison. Ce que nous voulons faire ressortir ici, c'est qu'une tumeur devant évoluer d'une façon bénigne, comme c'est le cas de l'épithélioma cutané, peut devenir maligne du fait seul d'avoir subi un traumatisme.

Pour nous résumer : l'épithélioma inoculé dans les testicules, qui est suivi presque toujours de métastases mortelles, change de caractère dès qu'il est inoculé dans la peau; tout en conservant sa structure initiale, la tumeur intracutanée n'a nulle tendance à l'envahissement : elle reste locale et, dans la suite, elle se résorbe. Cette tumeur intracutanée bénigne, lorsqu'elle est réinoculée dans les testicules ou lorsqu'elle est opérée, est susceptible de récupérer sa virulence. Nous assistons là à un phénomène que nous avons déjà observé au sujet du sarcome de la souris.

..

L'analogie entre l'épithélioma du lapin et le sarcome de la souris s'étend-elle aussi au mécanisme de l'immunisation? Afin de nous en rendre compte, nous avons procédé, en raison de l'importance du problème, par trois étapes que voici :

Dans une première série d'expériences, nous avons essayé de nous rendre compte si une région de la peau, qui était déjà le siège des tumeurs intracutanées, se prête, après la résorption de ces dernières, à la réinoculation de l'épithélioma dans la peau. Voici, à titre d'illustration, une de ces expériences (voir le lapin F).

Lapin F; il reçoit dans la peau, en cinq points différents, une émulsion chargée d'épithélioma testiculaire. Cinq jours plus tard, on constate, au niveau de chaque piqûre, une tumeur qui, après avoir évolué d'une façon caractéristique, subit une involution, non moins caractéristique. Le 20 mai, on pratique, à la place même des anciennes tumeurs dont il ne reste plus trace, une nouvelle inoculation d'épithélioma dans la peau. La même inoculation est faite à 2 lapins neufs. Le 26 mai, on constate chez ces derniers de belles tumeurs typiques, alors que le lapin en expérience (F.) reste indemne.



L'état réfractaire de la région de la peau antérieurement inoculée, est-il limité à cette région ou bien s'étend-il à l'enveloppe cutanée tout entière? Voici une des expériences qui devaient nous fixer à ce sujet (voir le lapin G.).

Lapin G; il reçoit dans la peau du *flanc droit* une émulsion d'épithélioma testiculaire (26 avril). Les tumeurs qui apparaissent dans la semaine qui suit, se résorbent ultérieurement. Lorsqu'il n'en subsiste aucune trace, on réinocule le lapin dans les mêmes conditions, mais cette fois dans la peau du côté opposé, c'est-à-dire dans celle du *flanc gauche*. Ce lapin demeure indemne. Deux témoins, inoculés en même temps, réagissent d'une façon typique.

Donc, une première injection d'épithélioma en une région déterminée de la peau a pour effet de conférer l'immunité à la peau tout entière.

\*  
\*  
\*

Cela établi, il restait un dernier point à fixer, à savoir si un animal, préparé par la voie intracutanée, comme dans les expériences précédentes, est à même de résister à l'inoculation d'épithélioma dans les testicules. Plusieurs séries d'expériences ont été faites dans cet ordre d'idées. En voici une : elle a porté sur 8 lapins dont 3 antérieurement injectés dans la peau (I. K. L.), 3 lapins neufs (M. N. O.) et 2 lapins dont un avait reçu antérieurement dans la peau une émulsion d'épithélioma de souris (S.) et un autre, une émulsion de sarcome de rat (R.). Voici quelques détails de cette expérience.

Lapin I. — Le 9 juillet, il reçoit dans la peau, en deux points du flanc, une émulsion d'épithélioma de Pearce-Brown (testicule et métastases). Le 14 juillet, apparaissent deux tumeurs dont chacune atteint dans la suite le volume d'une petite noix. Le 9 août, ces tumeurs sont résorbées.

Lapin K. — Le 26 juillet, il reçoit dans la peau, en deux points, une émulsion de tumeur métastatique. Le 31 juillet, on constate au niveau de chaque point d'inoculation une tumeur qui atteint rapidement les dimensions d'une grosse cerise. Le 9 août, les tumeurs commencent à régresser pour disparaître complètement vers le 5 septembre.

Lapin L. — Le 27 juillet, il reçoit, dans les mêmes conditions que les deux précédentes, une émulsion d'épithélioma (P. B.). Les tumeurs, formées dans la suite, sont résorbées au début de septembre.

Lapins M. N. O. sont neufs.

Lapin S. — Le 22 juillet, il reçoit dans la peau 1 cent. cube d'émulsion de tumeur épithéliomateuse de souris.

Lapin R. — Le 22 juillet, il reçoit dans la peau 1 cent. cube d'émulsion de tumeur sarcomateuse de rat.

Le 7 septembre, on inocule aux 8 lapins, dans les testicules, une émulsion obtenue par broyage d'une tumeur épithéliomateuse des testicules (Pearce-Brown). Voici quels furent les résultats de cette expérience.

A partir du 14 septembre, on constate une grosse orchite néoplasique chez les 2 lapins (S. et R.), préparés avec les tumeurs hétérogènes, ainsi que chez 2 lapins neufs (M. et N.); le troisième lapin neuf (O.) présente une orchite tardive et notablement moins accusée que les autres, ce qui nous fit penser, au moment où nous avons publié la note préliminaire (1), que ce lapin échapperait à la maladie; cette supposition fut démentie par la suite, comme nous allons le voir. En effet, voici quel fut le sort de nos trois témoins.

Le témoin M. est mort le 2 octobre; à l'autopsie, il était trouvé porteur des métastases innombrables dans le péritoine et dans les organes, la rate exceptée.

Le témoin N. a été sacrifié le même jour (2 octobre): il présentait des métastases dans la cavité abdominale, beaucoup moins nombreuses que le précédent, et à la face inférieure du diaphragme.

Le troisième témoin O. est mort seulement le 19 octobre, avec des métastases énormes dans les reins, le foie, la vessie, les poumons; la rate présentait deux petites taches blanchâtres.

Les 2 lapins (S. et R.), préparés antérieurement avec des tumeurs malignes hétérogènes, ont été sacrifiés le 7 octobre. Tous les deux ont montré, à l'autopsie, un grand nombre de tumeurs métastatiques au niveau du mésentère et du diaphragme.

Quant aux 3 lapins (I. K. L.), qui avaient reçu, dans la peau, à titre de vaccination, dans le courant du mois de juillet, des émulsions de tumeurs de Pearce-Brown, ils demeurèrent complètement indemnes.

*Il ressort de l'ensemble de ces expériences que les lapins, porteurs d'épithélioma intracutané expérimental, acquièrent, après la résorption de ce dernier, l'immunité vis-à-vis de cette tumeur, que celle-ci soit inoculée dans la peau ou dans les testicules.*

Le pouvoir immunisant en question peut-il être obtenu autrement que par la voie intracutanée? Ce pouvoir est-il strictement spécifique? Quel en est le mécanisme? Ce sont autant de problèmes qui feront l'objet d'une prochaine publication.

(1) C. R. de l'Académie des Sciences, 201, p. 690.



**RECHERCHES**  
**SUR LE PHÉNOMÈNE DE TWORT-D'HÉRELLE**  
**(BACTÉRIOPHAGIE OU AUTOLYSE**  
**HÉRÉDO-CONTAGIEUSE)**

[QUATRIÈME MÉMOIRE] (1)

par E. WOLLMAN et M<sup>me</sup> E. WOLLMAN.

Au moment de la publication de notre dernier mémoire, la grande majorité des bactériologistes paraissaient avoir renoncé à l'hypothèse qui faisait des bactériophages (2) des virus parasites des bactéries. Dans une mise au point parue en juillet 1933, le bactériologiste allemand Hoder concluait notamment : « Tant de faits plaident contre la conception de d'Hérelle et de son école que sans donner la préférence à l'une quelconque des nombreuses hypothèses émises, nous pouvons dire, avec une certitude passable, que le bactériophage n'est pas un être vivant *sui generis* » (3).

Or, il ne paraît pas douteux que malgré cette « certitude passable » la théorie parasitaire ne jouisse actuellement d'un regain de faveur marqué. Des chercheurs compétents comme F. M. Burnet et C. H. Andrewes inclinent nettement dans ce sens et un partisan autrefois convaincu de la théorie diastasique, Gratia, semble s'y être rallié.

Ainsi que nous le faisons remarquer dans une *Revue* (4, récente, ce revirement doit être attribué surtout aux données dernièrement acquises sur les dimensions des éléments actifs dans la bactériophagie. Ces dimensions, constantes pour chaque

(1) Ces *Annales*, 39, 1925, p. 739; 41, 1927, p. 883; 49, 1932, p. 41.

(2) Nous emploierons indifféremment, au cours de cet exposé, les termes « bactériophages » et « facteurs lysogènes », ainsi que ceux de « bactériophagie » et « autolyse transmissible », ou, encore « autolyse hérédo-contagieuse ».

(3) Der gegenwärtige Stand der Bakteriophagenforschung. *Arch. f. Microbiol.*, 4, 1933, p. 589.

(4) *Bull. Inst. Pasteur*, 32, 1934, p. 945.

bactériophage, varient d'un bactériophage à l'autre et se trouvent présenter les mêmes valeurs que les dimensions de certains agents pathogènes dans lesquels on a accoutumé de voir des virus authentiques, c'est-à-dire des microbes de très petite taille (inframicrobes, Ch. Nicolle). Par contre, ces dimensions sont très supérieures à celles des molécules des diverses diastases étudiées à ce point de vue. La très grande majorité des auteurs n'envisageant que l'alternative : virus ou diastase, il n'en fallait pas plus pour déterminer, chez un certain nombre, le revirement que nous venons de signaler (1).

On ne saurait pourtant assez insister sur ce point. Ni l'état corpusculaire des facteurs lysogènes, établi depuis longtemps (d'Hérelle, Wollman), ni les dimensions des corpuscules ne sauraient être invoqués en faveur de leur nature parasitaire. Jointes à d'autres faits, ces données permettent bien de rejeter la théorie diastasique, elles ne nous autorisent guère à assimiler les bactériophages à des virus. Il faudrait, pour cela, démontrer leur autonomie complète, leur origine exogène, et tout semble plaider contre celle-ci.

Au moment de la publication de notre dernier mémoire, il a pu sembler même que la preuve de l'origine bactérienne des bactériophages eût été enfin faite. En effet, les recherches de Den Dooren de Jong (2) portant sur des bacilles sporulés spontanément lysogènes avaient montré que l'action lysogène subsistait dans les cultures provenant de spores chauffées à 90° et même à 100°. Les bactériophages correspondants étant détruits à 70°-75° leur production *de novo* et, par conséquent, leur origine endogène, bactérienne, semblaient avoir été ainsi définitivement établies.

Cette interprétation donnée aux résultats de ses expériences par Den Dooren lui-même paraissait parfaitement fondée. Pourtant, peu de temps après la publication des travaux de cet auteur, Cowles (3) ainsi que Adant (4) montrent que des bacilles

(1) Il est intéressant de constater que des essais d'estimer les dimensions des gènes, institués par trois voies différentes, ont fourni, respectivement, les valeurs de 21, 60 et 77 m.  $\mu$ ; c'est-à-dire des valeurs de même ordre que celles trouvées pour les facteurs lysogènes (G. R. de Beer, in « Microbes and Ultramicrobes », par A. D. Gardner).

(2) *Zentralbl. f. Bakt.*, I, 120, 1931, p. 1 et 15; 122, 1931, p. 277.

(3) *J. Bacter.*, 22, 1931, p. 121.

(4) *C. R. Soc. Biol.*, 111, 1932, p. 1055.



sporulés, non lysogènes, expérimentalement contaminés avec le bactériophage correspondant se comportent comme les souches lysogènes de Den Dooren : les cultures issues de spores portées à 100° contiennent du bactériophage actif, alors que celui-ci est détruit, à l'état libre, à des températures beaucoup plus basses [70°-75°]. Vedder (1) montre, par ailleurs, que des bactériophages desséchés peuvent être exposés à la température de 100° sans perdre leur activité. Il devenait vraisemblable, dans ces conditions, que les facteurs lysogènes contenus dans les cultures issues de spores chauffées de Den Dooren étaient, eux aussi, non pas des éléments produits *de novo*, mais des éléments préformés ayant résisté au chauffage des spores. Les expériences de l'auteur hollandais perdraient donc la signification que lui-même ainsi que d'autres, leur avaient attribuée (2).

On sait, en effet, que pour les partisans du virus les souches lysogènes sont des souches vivant en symbiose avec le bactériophage, mais devenues résistantes à son action. Si artificielle que soit cette thèse elle n'est pas infirmée par les résultats de Den Dooren puisque les facteurs lysogènes trouvent au sein des spores des conditions leur permettant de résister à des températures élevées. Les bactériophages qui apparaissent dans les cultures après chauffage pourraient donc dériver d'éléments préexistant dans les cultures.

Il n'en est pas moins vrai que le fait même de l'existence de cultures spontanément lysogènes reste, pour les partisans de la théorie parasitaire, une véritable pierre d'achoppement. L'interprétation qu'ils en donnent est en désaccord avec de nombreux faits. C'est ainsi qu'une expérience fondamentale de Bordet et Renaux, semble permettre d'écarter une contamination latente (3). Ces auteurs montrent, en effet, qu'une souche de *B. coli* spontanément lysogène pour le *B. de Shiga*, perd cette propriété lorsqu'on la cultive en milieu décalcifié. Après une

(1) *Zentr. f. Bakt.*, 125, 1932, p. 411.

(2) Dans un travail récent (*Centr. f. Bakt.* I, 131, 1934, p. 401), den Dooren maintient, du reste, la production *de novo* des bactériophages dans les cultures issues de spores chauffées. Il se base, pour cela, sur certaines particularités des facteurs lysogènes ainsi produits et, notamment, sur leur spécificité très étroite : les bactériophages préexistants fonctionneraient comme « inducteurs ».

(3) Ces *Annales*, 42, 1928, p. 1284.

série de passages dans un tel milieu, ou alors, malgré la production de bactériophages la lyse du *B. de Shiga* fait constamment défaut, il suffit de reporter la souche en question en bouillon ordinaire pour voir cette lyse réapparaître. Certaines observations de F. M. Burnet, sur des souches lysogènes du groupe des *Salmonella*, se laissent, elles aussi, interpréter difficilement dans l'hypothèse d'une symbiose. C'est ainsi que toutes les souches de *B. paratyphique C*, étudiées par ce savant, se sont montrées lysogènes, et, fait remarquable, les bactériophages de toutes ces souches quelle que fût leur provenance (Russie, Amérique du Sud, Indes Orientales), se sont montrés identiques entre eux (1). Enfin, les recherches récentes de Den Dooren de Jong, sur divers bacilles sporulés (*B. megatherium*, *B. undulatus*, *B. mycoides*) ont fourni, indépendamment des expériences de chauffage dont il vient d'être question, des résultats qu'on comprendrait difficilement dans la théorie parasitaire. Pour chacun des germes étudiés, le savant hollandais constate que certaines souches sont lysogènes vis-à-vis de variétés asporogènes des mêmes germes. Il arrive même à la conclusion que, fort probablement, toutes les souches de germes sporogènes contiennent des bactériophages et qu'on décèlerait ceux-ci à l'aide de souches asporogènes appropriées. Nous verrons plus loin l'interprétation dont pareils faits nous paraissent susceptibles dans la conception des *facteurs héréditaires*.

De toute façon, il y a un intérêt évident, pour la compréhension du phénomène de l'autolyse transmissible, à poursuivre l'étude des souches spontanément lysogènes.

#### 1° RECHERCHES SUR LE MEGATHERIUM LYSOGÈNE.

Nous avons commencé par reprendre les expériences de Den Dooren de Jong sur le *B. megatherium* (3) et nous avons pu confirmer, en tous points, les résultats du savant hollandais. Les cultures sporulées de ce germe gardent intacte leur action

(1) *Journ. Pathol. et Bactér.*, 35, 1932, p. 851.

(2) *Zentralbl. f. Bact.*, I, 120, 1931, p. 1 et 15; 122, 1931, p. 271; 131, 1934, p. 401 et 414.

(3) Nous devons cette culture ainsi que la variété asporogène (mutilat) sensible à la grande amabilité de M. Den Dooren de Jong.



lysogène après chauffage à 90° pendant cinq à vingt-cinq minutes, et il apparaît bien que la résistance des facteurs lysogènes contenus dans les spores ne reconnaît pour limite que la résistance des spores elles-mêmes. En effet, un chauffage plus prolongé (quarante-cinq et même trente-cinq minutes) déterminait la mort de celles-ci. D'autre part, la fonction lysogène paraît bien dévolue à toutes les unités bactériennes. Des suspensions de spores portées à 90° pendant quinze minutes furentensemencées de manière à obtenir des colonies isolées. Toutes les cultures obtenues à partir de telles colonies isolées et éprouvées au point de vue de leur action lysogène ont donné des résultats positifs.

En possession de ces résultats, nous avons voulu les confronter, à la suite de Cowles et d'Adant, avec ceux qu'on obtient avec des germes sporogènes non lysogènes, expérimentalement « contaminés » avec le bactériophage correspondant. Nous avons eu recours pour cela, comme les auteurs cités, au *B. subtilis*, et, notamment, à la variété *muqueuse* décrite dans notre dernier mémoire et qui donne des cultures homogènes en bouillon et des cultures facilement émulsionnables sur gélose.

Pour obtenir des spores de *B. subtilis* soumis à l'action du bactériophage, nous avons procédé de la façon suivante.

Une suspension en eau physiologique de culture jeune de *B. subtilis* sur gélose est additionnée de bactériophage en excès. Après un contact de quarante-huit heures, le mélange estensemencé abondamment sur gélose inclinée; les cultures ainsi obtenues sont gardées trois semaines à la température de la chambre. Elles se présentent sous forme de couche translucide parsemée de rares colonies ayant l'aspect de celles de *Subtilis* normal. Ces cultures sont émulsionnées en bouillon et la suspension obtenue est distribuée en ampoules qu'on porte à 90° pendant quarante minutes. Ensemencé en bouillon et sur gélose, le contenu de ces ampoules donne, avant et après chauffage, des résultats identiques : le bouillon reste clair, la gélose présente une lyse plus ou moins complète avec traces de culture sur la partie supérieure. Mis en présence de *Subtilis* normal, le bouillon se montre, après comme avant chauffage, riche en facteurs lysogènes.

Le bactériophage a donc résisté, dans ces conditions, à un chauffage de quarante minutes à 90°, alors que mélangé à l'état libre, à des spores déjà formées, il est détruit à cette température en quelques minutes. Ces expériences montrent que dans le premier cas, il était bien contenu à l'intérieur des spores et qu'il présente, de ce fait, en confirmation des résultats de Cowles et de Adant, une résistance à la chaleur de même ordre que celle observée par Den Dooren pour les bactériophages des cultures lysogènes. Toutefois, contrairement à ce qui se passe pour celles-ci, il est facile d'obtenir à partir de spores chauffées de *B. subtilis* expérimentalement « contaminé » avec son bactériophage des souches normales, c'est-à-dire dépourvues de toute action lytique.

Il paraît probable que la résistance aux facteurs nocifs, conférée par les spores aux bactériophages, reconnaît un mécanisme identique, qu'il s'agisse de souches lysogènes ou de souches expérimentalement contaminées. C'est ce que tendent à confirmer les expériences sur l'action des hautes pressions.

On a pu étudier, antérieurement, grâce aux presses construites par J. Basset, l'action des hautes pressions sur un certain nombre de bactériophages (1). On avait constaté ainsi que le bactériophage staphylococcique, le plus labile à la chaleur, l'est, également, à la pression : absence de lyse à la dilution de 1 p. 10 après quarante-cinq minutes à 2.000 atmosphères, alors que le staphylocoque lui-même n'est tué qu'à 5.000 atmosphères. Les autres bactériophages (ceux du *B. typhique*, du *B. subtilis* et du *B. megatherium* (2) gardaient une grande partie de leur activité après pression à 4.500 atmosphères et n'étaient définitivement détruits que vers 7.000.

Or, lorsqu'on soumet à l'action de la pression non plus des facteurs lysogènes de *B. megatherium* à l'état libre, mais des spores de la souche lysogène, on constate que les cultures issues de spores portées à 9.500-10.000 atmosphères pendant quarante-cinq minutes gardent intacte leur fonction lysogène (2).

Les spores de *B. subtilis* expérimentalement contaminées

(1) J. BASSET, M<sup>me</sup> E. WOLLMAN, M. MACHEROUEF et M. BARDAGU, *C. R. Ac. Sc.*, 196, 1933, p. 4138.

(2) J. BASSET, E. WOLLMAN, M<sup>me</sup> E. WOLLMAN et M. MACHEROUEF, *C. R. Ac. Sc.*, 200, 1935, p. 1072.



avec le bactériophage correspondant, comme il a été dit plus haut, fournissent des résultats analogues. De telles spores ont pu être maintenues à 10.000 et même à 13.500-14 000 atmosphères (pression *maximum* étudiée) pendant quarante-cinq minutes sans qu'il y eût destruction des facteurs lysogènes. Par contre, de même que nous l'avons vu dans les expériences sur l'action de la chaleur, les bactériophages libres, mélangés à des spores déjà formées, ne sont guère protégés : destruction totale à 8.000 atmosphères.

Donc, qu'il s'agisse de la chaleur ou de la pression, les facteurs lysogènes contenus dans les spores « contaminées », se trouvent efficacement protégés contre l'action nocive. Les spores expérimentalement contaminées se comportent, à ce point de vue, comme celles des souches lysogènes et il est vraisemblable, ainsi que nous l'avons dit plus haut, que le mécanisme de la persistance des facteurs lysogènes est le même dans les deux cas.

On ne peut donc, dorénavant — ainsi que l'a fait Den Dooren et nous-mêmes à sa suite — conclure de la présence de bactériophages dans les cultures de germes lysogènes issues de spores chauffées (ou pressées), à leur formation *de novo*. Il paraîtrait plus simple d'admettre que dans ces cultures, comme dans celles expérimentalement contaminées avec des bactériophages, la persistance de la fonction lysogène soit due à la survie des facteurs lysogènes au sein des spores traitées.

Toutefois, une pareille conclusion ne s'impose pas sans plus, des résultats en apparence identiques pouvant relever de mécanismes différents. On pouvait se demander, notamment, si la présence de bactériophages chez *toutes les unités* d'une souche lysogène (contrairement à ce qui se passe pour les souches « contaminées ») s'expliquait uniquement par la survivance des bactériophages des spores. Ou bien plutôt, si celles-ci, sans renfermer des bactériophages préformés, jouissaient de la propriété de donner naissance à des formes végétatives lysogènes, c'est-à-dire produisant, elles, des bactériophages actifs. Le problème méritait d'être abordé par voie expérimentale.

Dans le cas où les spores de ces germes lysogènes renfermeraient des bactériophages préformés, elles devraient donner, chez l'animal, des sérums antilytiques. Dans le cas contraire,

les sérums préparés avec de telles spores débarrassées de bactériophages extérieurs (par chauffage, par exemple), devraient être privés d'anticorps anti-bactériophages.

EXPÉRIENCES. — 1. Des essais devaient nous apprendre, si des spores « contaminées » par le bactériophage correspondant et renfermant, par conséquent, à coup sûr, ce bactériophage à l'état préformé étaient susceptibles de donner un sérum antibactériophage.

Des spores de *B. subtilis* contenant le bactériophage correspondant (voir plus haut), sont recueillies sur boîtes de Roux, suspendues en eau physiologique et distribuées en ampoules de 5 cent. cubes. Celles-ci sont chauffées à 90° pendant vingt minutes, afin de détruire le bactériophage libre ou adhèrent aux spores.

Deux lapins reçoivent une injection sous-cutanée (récolte d'une boîte de Roux), et ensuite quatre injections intraveineuses (1/2 à 1 boîte). Le lapin 24 étant mort quatre jours après la quatrième injection intraveineuse. Le lapin 23 est saigné à blanc dix jours après la cinquième injection. L'épreuve de neutralisation du bactériophage pratiquée avec ce sérum (sérum 23) donne les résultats suivants :

1. *Bactériophage subtilis*, 2 gouttes + sérum 23, 5 gouttes : absence de lyse.
2. *Bactériophage subtilis*, 5 gouttes + sérum 23, 5 gouttes : absence de lyse.
3. *Bactériophage subtilis*, 10 gouttes + sérum 23, 2 gouttes : absence de lyse.
4. *Bactériophage subtilis*, 10 gouttes + sérum 23, 1 goutte : absence de lyse.

Témoins :

5. *Bactériophage subtilis*, 10 gouttes : lyse complète.
6. *Bactériophage subtilis*, 1 goutte : lyse complète.

Le sérum 23, préparé avec des spores chauffées de *B. subtilis* expérimentalement contaminé par le bactériophage correspondant, possède donc un pouvoir antibactériophage prononcé ainsi qu'on pouvait s'y attendre.

2. Avec une technique analogue, nous avons préparé des sérums pour des spores de *B. megatherium* (souche 899 spontanément lysogène) et, à titre de comparaison, des sérums pour les formes végétatives (cultures jeunes) de ce germe, ainsi que pour la variété asporogène (mutilat, dépourvue de pouvoir lytique).

Enfin, des sérums antibactériophages furent préparés avec des filtrats de *B. megatherium* 899 spontanément lysogène.

Le tableau suivant donne les résultats de l'épreuve de neutralisation du bactériophage du *B. megatherium* par les sérums ainsi obtenus. L'action du bactériophage était éprouvée sur une variété asporogène (mutilat) sensible à ce bactériophage.

A. Sérums anti-*Bactériophage megatherium* (nos 18 et 25).

1. *Bactériophage megatherium*, 5 gouttes + sérum 18, 1 goutte : lyse très marquée.
2. *Bactériophage megatherium*, 5 gouttes + sérum 18, 5 gouttes : 1 plage.
3. *Bactériophage megatherium*, 2 gouttes + sérum 18, 8 gouttes : pas de lyse.
4. *Bactériophage megatherium*, 10 gouttes + sérum 25, 1 goutte : lyse complète.
5. *Bactériophage megatherium*, 5 gouttes + sérum 25, 1 goutte : lyse marquée.

6. *Bactériophage megatherium*, 5 gouttes + sérum 25, 5 gouttes : quelques plages.
- B. Sérum anti-*megatherium* (formes végétatives) [n° 19].
7. *Bactériophage megatherium*, 5 gouttes + sérum 19, 1 goutte : absence de lyse.
8. *Bactériophage megatherium*, 5 gouttes + sérum 19, 5 gouttes : absence de lyse.
- C. Sérums anti-*megatherium* (spores) [n° 15 et 16].
9. *Bactérocophage megatherium*, 5 gouttes + sérum 15, 1 goutte : 40 plages.
10. *Bactériophage megatherium*, 5 gouttes + sérum 15, 5 gouttes : quelques plages.
11. *Bactériophage megatherium*, 5 gouttes + sérum 16, 1 goutte : 20 plages.
12. *Bactériophage megatherium*, 5 gouttes + sérum 16, 5 gouttes : 2-3 plages.
- D. Sérum anti-mutilat (*Megatherium asporogène*), [n° 33].
13. *Bactériophage megatherium*, 2 gouttes + sérum 33, 8 gouttes : lyse très marquée.
14. *Bactériophage megatherium*, 5 gouttes + sérum 33, 5 gouttes : lyse presque complète.
- E. Témoins :
15. *Bactériophage megatherium*, 5 gouttes : lyse presque complète.
16. *Bactériophage megatherium*, 2 gouttes : lyse très marquée.
17. *Bactériophage megatherium*, 1 goutte : une vingtaine de plages.

Ces résultats appellent quelques remarques. Tout d'abord, le bactériophage du *B. megatherium*, c'est-à-dire le filtrat de culture en bouillon de *B. megatherium* lysogène 899 employé dans ces expériences à un titre remarquablement bas. Au lieu des titres  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$  qu'on observe couramment avec les lysats bactériophagiques, les filtrats de *B. megatherium* 899 ne présentent, par rapport au mutilat (variété asporogène) utilisé dans ces expériences qu'un titre égal à  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  (1). Ce titre très bas explique la faible activité des sérums préparés avec ces filtrats (tube 1-5 A du tableau); ces sérums anti-bactériophage sont, en effet, beaucoup moins actifs que ceux préparés avec des cultures jeunes de *megatherium* 899 (formes végétatives) dont les suspensions contenaient des millions de germes par centimètre cube et par conséquent, ainsi qu'on le verra plus loin, des quantités sensiblement égales de facteurs lysogènes.

Comme il fallait s'y attendre, le sérum préparé avec la variété asporogène (mutilat) sensible au bactériophage du *B. megatherium*, mais non lysogène, était dépourvu de toute action neutralisante.

Enfin, pour revenir au but propre de ces expériences, les

(1) C. R. Soc. Biol., 119, 1935, p. 77.



spores de *B. megatherium* lysogène, chauffées à 90°, ont, elles aussi, donné des sérums doués de propriétés neutralisantes pour le bactériophage correspondant : ces spores contiennent donc des facteurs lysogènes comme tels et non seulement à l'état de potentialité. A vrai dire, le pouvoir neutralisant de ces sérums est très faible lorsqu'on le compare à celui du sérum préparé avec des formes végétatives ou bien à celui des sérums anti-spores de *Subtilis* « contaminé » par son bactériophage. Mais, ici encore, ces résultats s'expliquent parfaitement par la faible teneur en facteurs lysogènes du matériel employé dans la préparation des sérums. Le *B. megatherium* 899 sporule irrégulièrement et beaucoup moins abondamment que le *B. subtilis*, et ses spores sont assez sensibles au chauffage. Ainsi que le montrent les ensemencements, les suspensions employées étaient très pures en spores vivantes et, par conséquent, en bactériophages. Le titre des sérums correspondants était bas, comme celui des sérums préparés avec les bactériophages libres, et pour la même raison.

Quoi qu'il en soit, les recherches sur les propriétés antigènes des spores lysogènes, ainsi que des spores expérimentalement « contaminées », confirment et complètent les résultats fournis par les expériences sur l'action de la chaleur et de la pression. Elles montrent que si ces expériences ne permettent pas de différencier les souches lysogènes des souches « contaminées » c'est que, dans les deux cas, les bactériophages se retrouvent comme tels au sein des spores et sont de ce fait, protégés contre des actions qui les détruiraient à coup sûr, à l'état libre. La persistance de la fonction lysogène, dans les cultures issues de spores chauffées (ou pressées) reçoit ainsi une explication satisfaisante sans qu'il faille invoquer, dans le cas de souches lysogènes, une formation de bactériophages *de novo*. Ces expériences ne permettent donc pas d'éliminer l'hypothèse symbiotique des souches lysogènes et c'est par d'autres voies qu'il faut chercher à préciser la nature de ces souches.

Nous avons vu plus haut que le titre lytique du bactériophage du *B. megatherium* (c'est-à-dire des filtrats de culture de *B. megatherium* en bouillon) était relativement bas comparé au titre lytique des lysats bactériophagiques :  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  au lieu de  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ . Or, tous les éléments de cette souche

possédant la fonction lysogène il s'en suit qu'une très petite fraction de ces éléments met en liberté des facteurs lysogènes en milieu liquide (1). Le titre relativement bas, par comparaison avec celui des lysats bactériophagiques doit s'expliquer, en partie au moins, par le fait qu'il s'agit ici d'une souche elle-même insensible à l'action des bactériophages produits. Il était intéressant de rechercher comment se comportera cette souche sur milieu solide.

EXPÉRIENCES. — 1. Une culture jeune de *B. megatherium* 899 (quatorze heures d'étuve) est suspendue dans 20 cent. cubes d'eau physiologique et centrifugée pendant vingt minutes. On prélève un peu de liquide surnageant et on en ajoute X gouttes à une suspension de la variété asporogène (mutilat) sensible. Etalé sur gélose le mélange ne présente pas trace de lyse.

2. Une culture jeune (vingt heures) de *B. megatherium* est suspendue dans 15 cent. cubes d'eau physiologique. Après centrifugation, on prélève le liquide surnageant dont on ajoute un peu, tel que, à du mutilat sensible (*a*); le reste étant filtré sur bougie L<sup>3</sup> on en ajoute un peu à une autre portion de mutilat sensible (*b*). Les deux mélanges sont étalés sur gélose. Le lendemain le tube *a* montre des plages se présentant comme des zones stériles autour de colonies de *B. megatherium* (fig. 1). Le tube *b* ne présente pas de lyse.

3. Le culot de centrifugation de l'expérience précédente est remis en suspension dans de l'eau physiologique et gardé ainsi à la chambre pendant trois jours. On centrifuge à nouveau, on filtre le liquide surnageant et on ajoute XII gouttes de filtrat à du mutilat sensible. L'ensemencement sur gélose montre l'absence de toute lyse.

4. Le culot de centrifugation de l'expérience précédente est de nouveau remis en suspension dans de l'eau physiologique et conservé ainsi à la chambre pendant quatre jours. Traitée comme dans l'expérience précédente l'eau de lavage (troisième) se montre dépourvue de toute action lytique : 4 cent. cubes de cette eau de lavage sont ajoutés à 10 cent. cubes de bouillon. Ensemencé de mutilat sensible celui-ci ne montre aucune lyse.

5. Le culot de centrifugation de l'expérience précédente ayant subi trois lavages dans un délai de huit jours est repris par du bouillon et gardé à la chambre. Quelques gouttes de ce bouillon filtré produisent la lyse d'une suspension de mutilat sensible.

(1) Nous reviendrons dans un autre travail sur la signification de ce phénomène dont nous poursuivons l'étude.

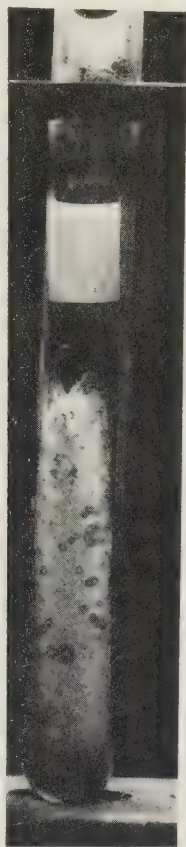


FIG. 1.

6. La gélose sur laquelle s'est développée une culture jeune de *B. megatherium* (enlevée par lavage) est raclée et émulsionnée dans de l'eau physiologique. Le mélange est agité à diverses reprises. Après une heure de contact l'émulsion est filtrée (sur papier et bougie); XXV gouttes de filtrat ne donnent aucune lyse avec le mutilat sensible.

Ces expériences montrent que dans les conditions de nos expériences, les cultures de *B. megatherium* 899 sur gélose sèche (sans eau de condensation) ne contiennent pas de facteurs lysogènes libres et que ceux-ci ne se retrouvent pas davantage, dans la couche superficielle de la gélose. Reprises par de l'eau physiologique, ces cultures n'y abandonnent pas de bactériophage, même après contact très prolongé. Ce bactériophage se retrouve à l'ensemencement des cultures lavées en bouillon, de même que dans des cultures mixtes avec variété sensible, dans certaines conditions, sur gélose. On doit en conclure que les cultures de *B. megatherium* 899 sur gélose renferment bien des facteurs lysogènes mais que ceux-ci s'y trouvent exclusivement à l'état intracellulaire.

On pouvait, dans ces conditions, chercher à les en extraire. Quelques essais institués à cet effet avec de l'antiformine n'ont donné que des résultats négatifs. Ce fait n'avait rien d'étonnant; ce qui l'était plus, c'étaient les résultats négatifs d'expériences de broyage. Des cultures jeunes de *Megatherium* sur gélose, mises en suspension dans de l'eau physiologique, furent agitées pendant deux-trois heures avec des perles de verre. Alors que l'examen microscopique y montrait surtout des débris amorphes ne prenant plus le *Gram*, l'émulsion restait dépourvue de toute action lytique pour la variété sensible. Une seule fois, avec un filtrat de telle émulsion nous avons pu obtenir 2-3 plages.

Nous eûmes alors l'idée de recourir au lysozyme. On sait que Fleming a désigné sous ce nom un principe contenu dans certains produits organiques (larmes, blanc d'œuf) et qui dissout avec une intensité plus ou moins marquée certains germes saprophytes. On pouvait espérer qu'il agirait sur le *B. megatherium* et, de fait, une suspension de ce germe mise en présence de quelques gouttes de blanc d'œuf à 1 p. 5 se clarifie en vingt à trente minutes. Chose intéressante, les suspensions ainsi traitées contiennent du bactériophage libre.

EXPÉRIENCES. — 1. Une suspension de culture jeune de *B. megatherium* sur gélose est répartie en deux tubes. L'un reçoit V gouttes de blanc d'œuf



(dilution à 1 p. 5). Une heure plus tard, le contenu de chacun des tubes est filtré sur bougie L<sup>3</sup>; VIII gouttes de chaque filtrat sont ajoutées à des suspensions de *mutital* sensible; IV gouttes de mélange sont étalées sur gélose inclinée. Alors que le filtrat témoin ne donne pas de lyse, celui provenant de la suspension traitée par le lysozyme donne 50 plages.

2. Même expérience que ci-dessus, la suspension de *B. megatherium* étant faite dans du bouillon au lieu d'eau physiologique.

Résultats : lyse très forte pour la suspension traitée par le lysozyme; pas de lyse pour le témoin.

Donc, les suspensions de culture de *B. megatherium* sur gélose dépourvues par elles-mêmes d'action lytique acquièrent celle-ci après traitement par le lysozyme. Fait intéressant, il peut en être quelquefois de même de suspensions de *B. megatherium* désagrégées mécaniquement par agitation. Nous avons vu plus haut que de telles suspensions ne contiennent pas de bactériophage libre. Celui-ci pourtant n'y est pas détruit; additionnées de lysozyme de telles suspensions peuvent mettre en liberté des facteurs lysogènes.

Les faits que nous venons de rapporter montrent que les cultures de *B. megatherium* sur gélose contiennent bien des facteurs lysogènes, mais que ceux-ci s'y trouvent à l'état intracellulaire.

Le traitement de telles cultures par le lysozyme constitue un moyen simple et commode pour la mise en liberté de ces bactériophages intracellulaires. Il permet, par là-même, d'aborder, avec une technique nouvelle, un problème important pour l'interprétation de la bactériophagie : celui des rapports numériques entre bactéries et bactériophages.

Nous avons déjà fait remarquer ailleurs (1) que le nombre d'éléments actifs contenus dans une unité de volume de lysat (titre lytique) paraissait sensiblement égal à celui de germes atteints par la lyse bactériophagique directe (2). Ces indications fournies par l'estimation approximative de la teneur en germes des cultures soumises à la lyse bactériophagique trouvent leur confirmation avec une technique différente. On racle la surface

(1) *Ces Annales*, 49, 1932, p. 41.

(2) C'est-à-dire sans tenir compte des germes atteints par la lyse secondaire. Cette dernière, nous le rappelons, particulièrement intense avec le staphylocoque, est due à des autolysines libérées en excès, soit sous l'influence de bactériophages, soit par d'autres mécanismes (*Ibid.* et *C. R. Sec. Biol.*, 112, p. 164, 1933).

d'une plage et l'on émulsionne le produit du raclage dans de l'eau physiologique. Si l'on ajoute cette émulsion à une suspension de germes sensibles et qu'on étale le tout sur gélose, on trouve que le nombre total de facteurs lysogènes correspondant à la surface de la plage est de même ordre (généralement en dessous) que le nombre de bacilles qu'aurait pu contenir cette plage (Expériences sur *B. megatherium*).

Interprétés dans les termes de la théorie parasitaire, ces résultats sont bien faits pour surprendre. En effet, étant données les dimensions relatives des bactéries et des bactériophages (de l'ordre de 1 p. 1.000 000, dans le cas du *B. megatherium*, en acceptant pour la dimension du bactériophage du *B. megatherium* une valeur correspondant à la moyenne de celles établies pour divers bactériophages) on se serait attendu à ce que le nombre de ces derniers fût un multiple plus ou moins considérable du nombre des cellules parasitées. Or, on le voit, c'est loin d'être le cas.

La mise en liberté des facteurs lysogènes intracellulaires sous l'action du lysozyme permet, dans le cas du *B. megatherium*, de serrer le problème de plus près (1). On pouvait, en effet, en traitant par le lysozyme des suspensions de *B. megatherium* d'une teneur connue, se faire une idée du rapport existant entre le nombre de germes et le nombre de bactériophages qu'ils contiennent.

Voici, à titre d'exemple, une expérience type choisie parmi de nombreux essais institués dans cet ordre d'idées.

On prépare des dilutions successives d'une suspension de *B. megatherium* 899 (culture jeune sur gélose). On ensemence 0 c. c. 1 des dilutions ainsi obtenues en gélose fondue qu'on coule en boîtes de Petri. La numération des colonies donne, pour trois boîtes, respectivement, 500 (environ) 52 et 14 colonies.

D'autre part, après traitement par le lysozyme, 0 c. c. 1 de chacune des dilutions est ajouté à V gouttes de suspension de mutilat sensible et la totalité du mélange est étalée sur la gélose d'une boîte de Petri. La numération des plages de ces boîtes donne, respectivement : plus de 400; 50 (environ) et 7-8 plages (fig. 4-6, planche I). Dans d'autres expériences on a

(1) *C. R. Soc. Biol.*, **119**, 1935, p. 47.

obtenu respectivement, pour le nombre de colonies et celui de plages, les chiffres suivants. Colonies :  $\pm 1.000$ , 200, 150, 70. Plages : lyse marquée, 150, 130-140, 70.

Il y a donc une concordance frappante entre les nombres de colonies fournis par les boîtes de Petri de la première série et ceux de plages fournis par les boîtes de la seconde. Il y aurait, pour la souche étudiée, autant de bactériophages mis en liberté sous l'action du lysozyme qu'il y avait d'éléments bactériens (déterminés par ensemencement) dans la suspension traitée. Nous voilà loin des résultats que semblerait faire prévoir la théorie parasitaire et d'après lesquels le premier de ces nombres aurait dû être un multiple plus ou moins élevé du second. L'écart entre le rapport fourni par l'expérience et celui que semblait faire prévoir la théorie parasitaire devient encore plus grand du fait que le *B. megatherium* forme des chaînettes de longueur variable. Admettant que chaque colonie procède d'une chaînette dans l'expérience ci-dessus, le nombre de bactériophages mis en liberté se trouverait être celui des chaînettes et inférieur, par conséquent, à celui d'éléments bactériens individuels.

On obtient des résultats analogues si, au lieu de cultures sur gélose, on utilise des cultures en bouillon. Nous avons vu que de telles cultures de *B. megatherium* contiennent, à l'état libre,  $10^3$ ,  $10^4$  bactériophages par centimètre cube. Fait curieux, le plus souvent ce nombre n'augmente pas de façon considérable sous l'action du lysozyme; les cultures s'éclaircissent sans qu'il y ait modification très marquée du titre lytique (1). Mais si au lieu de traiter directement ces cultures en bouillon par le lysozyme on les centrifuge et qu'on les remette en suspension dans de l'eau physiologique, les résultats sont les mêmes que ceux qu'on obtient avec les cultures sur gélose : le nombre de plages fourni par une suspension ainsi traitée est très sensiblement égal au nombre de colonies donné par la suspension avant traitement par le lysozyme.

1) Des recherches en cours nous permettront, peut-être, de préciser la signification de ce fait, ainsi que celle du rapport que nous venons d'établir entre le nombre de colonies fournies par une suspension de *B. megatherium* et celui de facteurs lysogènes qu'elle met en liberté sous l'action du lysozyme. (Voir *C. R. Soc. de Biol.*, 121, 1936, p. 126, note publiée depuis la rédaction de ce mémoire.)



Ces résultats nous paraissent malaisés à interpréter dans la théorie parasitaire et viennent s'ajouter aux difficultés déjà très grandes qu'oppose à cette théorie l'étude des souches lysogènes.

## 2° BACTÉRIOPHAGIE ET AUTOLYSE. MÉCANISME ET SIGNIFICATION DU PHÉNOMÈNE DE L'AUTOLYSE TRANSMISSIBLE.

Nous venons de voir qu'à défaut de la preuve de l'origine bactérienne des facteurs lysogènes qu'on avait pensé un moment trouver dans les résultats de Den Dooren de Jong, l'étude de la souche lysogène de *B. megatherium* apporte de nouvelles présomptions contre l'hypothèse parasitaire. Le revirement d'opinion en faveur de celle-ci que nous signalions au début de ce travail ne nous paraît donc nullement justifié.

Ce revirement, nous l'avons vu, est dû surtout à la carence des théories diastasiques en présence des données récentes sur la nature corpusculaire des éléments actifs et, tout particulièrement, sur les dimensions de ces éléments. Or, ces données (voir plus haut) sont non seulement compatibles avec la conception des *facteurs héréditaires* (1) que nous défendons depuis longtemps, elles contribuent, en quelque sorte, à la conditionner. Il en est de même des données que nous venons d'exposer sur les rapports numériques entre bactéries et bactériophages, ainsi que des relations si particulières, chez les germes sporulés, entre souches lysogènes et souches sensibles et sur lesquelles nous allons revenir. Nous allons examiner à la lumière de ces données et des faits qu'il nous reste à exposer le mécanisme et la signification de la bactériophagie, ainsi que les rapports de ce phénomène avec les processus d'autolyse.

Pour les partisans des théories diastasiques la bactériophagie est une exagération ou une déviation de ce dernier phénomène qui, de normal, devient pathologique. Les éléments actifs, ou bactériophages, ne sont autre chose que des lysines ou, plutôt, des autolysines. Quitte à laisser dans l'ombre les traits les plus importants du phénomène considéré on cherche à rendre compte de sa manifestation la plus frappante, la lyse.

(1) Nous préférons provisoirement ce terme à celui de *gènes* qu'on serait tenté d'employer, mais qui a un sens trop précis et désigne des éléments *chromosomiques* de cellules d'organismes supérieurs.

On sait, pourtant, que la lyse, ou mieux, l'autolyse, peut se produire sous l'action de substances dépourvues par elles-mêmes de toute fonction lytique propre. Nous avons pu montrer notamment, que les antiseptiques les plus divers peuvent, dans certaines conditions, déterminer une autolyse prononcée (1) : Il suffit d'en introduire des quantités déterminées, assez faibles, dans des cultures jeunes en bouillon nutritif.

Si, par exemple, à une série de tubes de bouillon contenant des cultures jeunes (de quatre à cinq heures) de *B. coli*, on ajoute des quantités croissantes de formol on constate, pour certains de ces tubes, une lyse plus ou moins complète du contenu. Si l'on se sert de formol du commerce dilué à 1 pour 5 et qu'on en ajoute de I à X gouttes par tube de 10 cent. cubes environ, on constate que la lyse la plus intense a lieu dans les tubes ayant reçu I à II gouttes; elle s'atténue ensuite et fait défaut dans les tubes contenant VIII gouttes et plus de formol. A l'examen microscopique, les germes des tubes présentant la lyse fixent mal les colorants et prennent un aspect caractéristique d'« ombres » (fig. 2). Les résultats sont les mêmes qu'on s'adresse à des bactéries non protéolytiques (*B. coli*, *B. de Shiga*) ou à des bactéries protéolytiques (*Staphylococcus*, *Bactéridie charbonneuse*).

Ces recherches furent étendues à d'autres antiseptiques, tels que l'acide phénique, le sublimé, le cyanure de mercure. Avec toutes ces substances on observait, pour des teneurs déterminées, une lyse plus ou moins intense des bactéries traitées.

On voit donc que des substances non seulement dépourvues de toute action lytique propre, mais réputées comme des coagulants énergiques, peuvent, dans certaines conditions, déclencher la lyse bactérienne (2).

Fait intéressant, ces conditions rappellent, à certains points, celles de la lyse bactériophagique. Comme celle-ci, l'autolyse en présence des antiseptiques n'a lieu qu'avec des cultures jeunes et en milieu nutritif. Elle fait défaut en eau physiolo-

(1) *C. R. Soc. Biol.*, 3, 1932, p. 578

(2) Les faits que nous venons d'exposer confirment en tous points les idées exprimées par Maurice Nicolle dans son beau mémoire : L'autolyse, étude de Biologie générale. Ces *Annales*, 27, 1913, p. 97. On y lit notamment : « Des agents, envisagés comme coagulants, détermineront le *suicide* au lieu de la mort brutale, quand ils opéreront avec discrétion » (p. 107).

gique : des suspensions de bactéries jeunes en ce milieu non seulement ne s'autolysent pas en présence de petites quantités d'antiseptiques mais se trouvent, au contraire, stabilisées par rapport aux suspensions témoins.

Pendant quelque temps, nous avons cru qu'une certaine survie des bactéries était une condition nécessaire pour que l'autolyse par antiseptiques eût lieu. En effet, avec les doses efficaces, les ensemencements restaient positifs pendant quelques heures. Des observations ultérieures montrèrent que cette autolyse pouvait se produire avec des germes morts (tout au moins des germes dont l'ensemencement reste négatif). En effet, si l'on porte en bouillon une suspension de bactéries jeunes traitées par le formol en eau physiologique, on voit l'autolyse se produire. Les résultats sont toutefois meilleurs lorsque la durée d'action du formol, en eau physiologique, n'a pas été trop longue.

Ces faits établissent que l'autolyse peut être déclenchée par des substances dépourvues de toute action lytique propre et viennent ainsi à l'appui de la thèse que nous avons défendue de très bonne heure. Avec Durand Reynals (1), nous avons montré, notamment, que rien n'autorisait à assimiler les bactériophages à des autolysines dont l'existence même, du reste, était purement hypothétique au moment de ces recherches. Par la suite, cette lacune a été comblée et les autolysines ont pu être mises en évidence dans un certain nombre de cas (2). L'étude de leurs propriétés et de leur comportement, au cours de la lyse, achève de montrer l'inanité du rapprochement qui sert de base aux théories diastasiques (3).

Les autolysines présentent, il est vrai, comme les bactériophages, une spécificité biologique accusée, mais celle-ci est en quelque sorte plus homogène : les autolysines d'un groupe de bactéries, inactives en dehors de ce groupe, paraissent agir sur tous les membres de celui-ci. C'est ainsi que les autolysines, mises en liberté lors de la lyse biliaire d'un *Pneumocoque* vivant et virulent, dissolvent tous les *Pneumocoques* vivants ou tués. Les autolysines, libérées lors de la lyse d'un *Staphylo-*

(1) *C. R. Soc. Biol.*, **94**, 1926, p. 1330.

(2) Ces *Annales*, **49**, 1932, p. 41; *C. R. Acad. Sc.*, **198**, 1931, p. 1642.

(3) *C. R. Soc. Biol.*, **115**, 1934, p. 1616.



coque sensible par son bactériophage (ou par anaérobiose), agissent sur tous les *Staphylocoques* vivants ou tués. Enfin, les autolysines du *B. subtilis* s'attaquent aux germes de ce groupe et aussi, comme on va le voir, à la bactéridie charbonnense.

En plus des exemples que nous avons déjà apportés de cette spécificité particulière des autolysines, nous allons citer les cas suivants. Nous avons montré ailleurs (1) que les autolysines, mises en liberté au moment de la lyse d'un *Staphylocoque* par son bactériophage, dissolvent non seulement ce même *Staphylocoque* tué au préalable par chauffage, mais aussi d'autres *Staphylocoques* parfaitement réfractaires au bactériophage employé, et cela, qu'ils soient vivants ou morts. L'expérience montre que cette action s'étend à des germes du groupe — du reste fort voisin — des sarcines. En effet, si à du bouillonensemencé de sarcine, on ajoute un peu de *Staphylocoque* et 1 goutte de bactériophage correspondant à celui-ci, on constate que le bouillon s'éclaircit complètement alors que les tubes témoins ne contenant que des sarcines et du bactériophage (sans *staphylocoque* sensible), donnent des cultures normales.

Contrairement aux bactériophages, les autolysines, mises en liberté par un procédé approprié, agissent *non seulement sur des germes vivants mais aussi sur des germes tués*, si ceux-ci ne sont pas trop altérés (chauffage à température élevée). Les bactéries, tuées par chauffage modéré, constituent même un matériel de choix pour l'épreuve des autolysines, car on évite ainsi les causes d'erreur résultant de repousses éventuelles.

On peut se convaincre, avec cette technique, que les autolysines du *B. subtilis*, mises en liberté sous l'action du bactériophage correspondant, agissent non seulement sur des bactéries de même espèce, vivantes ou tuées, mais aussi sur la bactéridie du charbon. On prépare une suspension de charbon asporogène (2) dans de l'eau physiologique et on chauffe à 60° pendant une heure. On ajoute VI gouttes de cette suspension à un tube de bouillon assez largementensemencé de *B. subtilis*, ainsi qu'à un tube de bouillon témoin. Ces deux tubes reçoivent,

(1) Ces Annales, 49, 1932, p. 41; C. R. A. ad. Sc., 198, 1934, p. 16-2.

(2) La souche de charbon asporogène, utilisée dans ces expériences, a été aimablement mise à notre disposition par notre collègue A. Staub. Nous l'en remercions vivement.

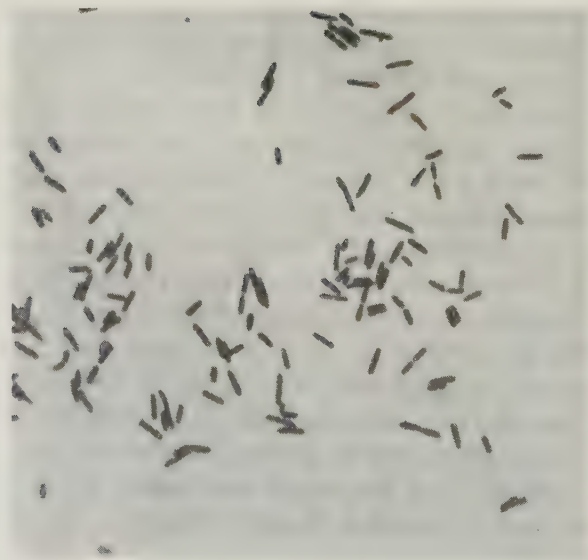


FIG. 2 a.



FIG. 2 b.

FIG. 2. — Autolyse bactérienne en présence de formol. *a*, culture normale jeune de *B. coli* B; *b*, même culture traitée par le formol à faible dose (11 gouttes d'une solution à 1 p. 5 pour 10 cent. cubes de culture).



Fig. 3 b.

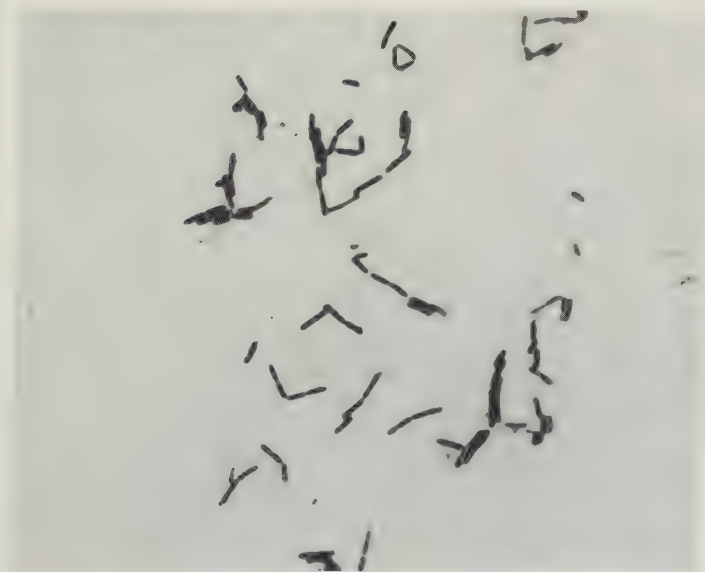


Fig. 3 a.

FIG. 3. — a. « Lyse secondaire » du *B. anthracis* : suspension de *B. anthracis* sporogène chauffée à 90° et la même suspension en présence de *B. subtilis* et le son bactériophagie en bouillon.



en plus, I à II gouttes de bactériophage de *B. subtilis*. Le lendemain, la lyse est très prononcée dans le premier tube, alors que les bactériidies du tube témoin sont intactes (fig. 3).

Non seulement il n'y a pas reproduction des autolysines, mais celles-ci s'épuisent au cours de leur action : une quantité donnée d'autolysines, libérée par la lyse d'une certaine quantité de corps microbiens, ne pourra amener la *lyse secondaire* que d'une quantité nouvelle déterminée de germes.

Les autolysines se montrent quelque peu plus résistantes à la chaleur que les bactériophages correspondants; elles résistent également à des pressions qui inactivent ceux-ci (1). Les bactéries jeunes y sont plus sensibles que les bactéries de cultures âgées. Enfin, nous l'avons dit plus haut, sous l'action d'un chauffage intense (120°), les bactéries peuvent devenir réfractaires à l'action des autolysines.

On voit donc que l'étude des autolysines souligne, s'il en était besoin, l'impossibilité qu'il y a à y assimiler les éléments actifs de l'autolyse héréditaire-contagieuse.

Il peut paraître superflu d'insister sur ces faits, alors que les théories diastasiques semblent pouvoir être mises hors de cause. Nous ne le croyons pas, car il suffit de parcourir la littérature du problème pour se rendre compte de la difficulté que les chercheurs semblent éprouver à ne pas confondre les notions de bactériophagie et de lyse et à ne pas attribuer, aux éléments actifs de la bactériophagie, une fonction lytique propre. Dans la théorie parasitaire, la lyse serait le fait de diastases sécrétées par le virus bactériophage (d'Hérelle, Sertic). Dans les théories endogènes — c'est-à-dire celles qui attribuent aux éléments actifs une origine bactérienne — ces éléments étaient assimilés, au début, à des ferments lytiques (Twort, Kabeshima, premières notes de Bordet et Ciuca, bien d'autres encore). Plus tard, Bordet et Renaux (2) admettent que le « principe lytique » n'est pas « directement et immédiatement lytique à la façon d'une diastase », mais qu'il engendre, ou mieux, « qu'il induit chez le microbe réceptif une perturbation aboutissant à l'autolyse ».

Cette façon de voir nous paraît mettre le problème de la bactériophagie sous son vrai jour. Ainsi que nous le disons ail-

(1) *C. R. Acad. Sc.*, 200, 1935, p. 1072.

(2) *Ces Annales*, 42. 1928, p. 1304.

leurs (1), l'autolyse ne couvre que le second temps, banal en quelque sorte, du phénomène. Ce second temps est le fait des *autolysines* que nous venons d'étudier et qui sont les mêmes dans tous les cas, quel que soit le mécanisme qui déclenche l'autolyse. Quant à la bactériophagie, on pourrait dire qu'elle n'est pas tant une *autolyse transmissible* qu'une *transmission d'autolyse* : ce qui la caractérise, ce n'est pas l'autolyse, mais le mécanisme qui déclenche celle-ci et qui en assure la transmissibilité. C'est à expliquer ce mécanisme — premier temps du phénomène — que doit viser toute tentative d'interpréter la bactériophagie.

Si l'on fait abstraction de quelques artifices, on peut dire que la théorie parasitaire y parvenait sans trop d'efforts, mais elle se heurte à l'origine bactérienne probable des éléments actifs : les données relatives aux souches lysogènes laissent, à cet égard, peu de doutes.

Avec la théorie du virus, celle des *facteurs héréditaires* est la seule qui n'escamote pas cela même qu'il s'agit d'expliquer : la reproduction des éléments actifs et la transmissibilité du phénomène. Elle a, en plus, sur la première, l'avantage de concilier les propriétés et le comportement de ces éléments avec leur origine cellulaire. Elle s'accommode fort bien, enfin, des données récentes sur les dimensions des bactériophages ainsi que des faits révélés par l'étude des cultures lysogènes.

Les objections à cette théorie, on le conçoit, n'ont pourtant pas fait défaut et nous avons essayé d'y répondre de notre mieux (2). Il y a toutefois une objection de Bordet et Renaux (3) sur laquelle nous voudrions revenir, car elle porte sur un point important et que semblent éclairer certaines données récentes. Bordet et Renaux se demandent, notamment, pourquoi s'ils « sont des propriétés héréditaires matérialisées » « les principes peuvent déclencher des processus lytiques ».

Dans notre réponse (4) nous envisagions surtout les cas de bactériophagie spontanée. Les bactériophages devenaient, dans

(1) *Bull. Inst. Pasteur*, 32, 1934, p. 945.

(2) Voir, notamment, *Ces Annales*, 43, 1929, p. 359; 49, 1932, p. 41, ainsi que *Bull. Inst. Pasteur*, 32, 1934, p. 945.

3) *Ces Annales*, 42, 1928, p. 1304.

4) *Ces Annales*, 43, 1929, p. 339.

ces cas, les supports d'une variation brusque et, comme telle, souvent pathologique, pouvant aboutir par elle-même à l'autolyse. Les facteurs d'une telle variation devenaient, tout naturellement, des *facteurs lysogènes*. Il était intéressant de chercher à répondre à la question de Bordet et Renaux en tenant compte des cas bien établis et de plus en plus nombreux de cultures lysogènes (1).

Les recherches sur l'action des antiseptiques que nous avons rapportées plus haut nous montrent que les substances les plus différentes dépourvues de tout pouvoir lytique propre, peuvent déclancher, dans certaines conditions, l'autolyse bactérienne.

La diversité même des substances pouvant déterminer l'autolyse permet d'éliminer une action physique ou chimique particulière et fait penser qu'il suffit d'une perturbation quelconque (pas trop brutale) pour que l'autolyse s'ensuive.

Quelle perturbation peut-on invoquer dans le cas d'une souche lysogène, parfaitement normale par ailleurs, agissant sur une souche sensible ? Les cas des germes sporulés lysogènes étudiés par Den Dooren de Jong semblent fournir à cet égard une indication concrète.

Dans tous ces cas (*B. megatherium*, *B. mycoïdes*, *B. undulatus*) ce sont des souches sporulées qui se montrent lysogènes vis-à-vis de variétés asporogènes (mutilats) des mêmes germes. Nous avons dit plus haut combien pareil fait était difficile à concilier avec la théorie du virus. Il paraît évident qu'action lysogène d'un côté, sensibilité de l'autre, sont en rapport avec la différence de caractères des souches mises en présence. Les faits nous paraissent s'interpréter avec une grande simplicité dans la conception des *facteurs héréditaires*.

Admettons, pour fixer les idées, que la propriété de sporuler (et il pourrait s'agir de tout autre caractère) [2] soit liée chez le *B. megatherium* 899, par exemple, à un support matériel stable.

(1) Il nous paraît probable que les cultures lysogènes sont la source de la plupart de nos bactériophages. On peut se demander d'autre part si, comme l'admet Den Dooren de Jong pour les germes sporulés, toute souche bactérienne ne serait pas lysogène par rapport à certaines autres souches du même groupe.

(2) Par l'aspect des colonies, notamment, le *B. megatherium* sporulé et sa variété asporogène rappellent, respectivement, les formes R et S de certains germes.



Mis en présence de cellules de la variété asporogène ce *facteur* y trouve bien les conditions requises pour son maintien et même pour sa multiplication alors que ces cellules elles-mêmes devenues inaptes à réagir normalement (sporulation) éprouvent *du fait de sa présence* une perturbation suffisante pour aboutir, dans certaines conditions, à la lyse (1).

Le phénomène paraît présenter une certaine généralité puisque Den Dooren l'a retrouvé chez diverses bactéries sporulées du sol étudiées à ce point de vue (2). Toutefois, la présence d'un caractère d'un côté, son absence de l'autre, ne constituent pas des conditions suffisantes de l'autolyse héréditaire, aussi n'est-ce qu'en faisant agir les unes sur les autres un certain nombre de souches de chaque espèce qu'on arrive à mettre en évidence des cas de bactériophagie nette.

Quoi qu'il en soit, la signification de la bactériophagie, semble devoir dans notre conception être étendue. Les bactériophages ne seraient pas, nécessairement les supports matériels, les *facteurs*, d'une variation pathologique. Ils pourraient fort bien, dans de nombreux cas, être les supports de caractères normaux et ne devenir *pathologiques* que pour les variétés ayant perdu ces caractères. Ce n'est qu'indirectement, en quelque sorte, qu'ils deviennent, dans ces cas, des *facteurs lysogènes* (3).

Les notions que nous venons de développer nous paraissent répondre de façon satisfaisante à la question posée par Bordet et Renaux, quant au mécanisme par lequel des « propriétés héréditaires matérialisées » peuvent déclencher « des processus lytiques ». Ces notions, basées sur des faits relatifs aux bactéries lysogènes sporulées se rapprochent, du reste, étroitement, des considérations admirablement exprimées par Bordet et Renaux eux-mêmes dans le mémoire cité.

Ces auteurs parlent, notamment, d'un « principe » qui, « normal par rapport à la bactérie qui, primitivement, spontanément et sans en souffrir, le sécrète, se comporte comme un

(1) Il nous sera permis de rappeler que même dans la sporulation normale le corps bactérien devient le siège de processus d'autolyse.

(2) *Zentralbl. f. Bakt.*, 1., 122, 1931, p. 277; 131, 1934, p. 401.

(3) Dans les processus que nous avons rapproché de l'autolyse héréditaire (tumeurs filtrables, mosaïques des plantes) les éléments actifs seraient des *facteurs*, des *gènes*, comme dans la bactériophagie spontanée, correspondant à des variations pathologiques (*facteurs oncogènes*, etc.).

facteur étranger et nuisible lorsque, venant s'intégrer dans la physiologie d'un microbe différent du premier, il en trouble le fonctionnement vital au point de provoquer sa destruction (1) ». Toutefois, les propriétés des facteurs lysogènes (dimensions, etc.), leur comportement (autonomie, multiplication), enfin, certains faits décrits au cours du travail présent (rapports numériques avec les bactéries) s'opposent, nous semble-t-il, à ce qu'on assimile ces facteurs à des principes « sécrétés » par les bactéries. Ainsi que nous l'avons toujours soutenu, origine à part, une fois libérés, les éléments actifs dans la bactériophagie se comportent, à bien des égards, comme des virus.

Dès son premier mémoire, l'un de nous avait suggéré qu'un mécanisme analogue à celui que nous proposons pour le phénomène de la bactériophagie pourrait bien intervenir dans d'autres processus à allure infectieuse et attribués d'habitude à des virus. Notre façon de voir a été adoptée pour les tumeurs filtrables par des chercheurs d'une compétence reconnue comme Murphy et Claude. D'autre part, les faits mis en relief au cours de ces dernières années relativement à la « synthèse » et à « l'analyse » de certaines maladies des plantes nous paraissent cadrer beaucoup mieux avec les données de la génétique qu'avec la notion des associations microbiennes.

Quoi qu'il en soit de la nature réelle de ces processus, ainsi que d'autres encore, il nous paraît probable que le grand groupe des maladies dites à virus, comprend à côté de maladies à virus authentiques, c'est-à-dire à infra-microbes (Ch. Nicolle) des processus dont les agents reconnaissent une origine cellulaire.

Il ne semble pas douteux que c'est des premiers que relèvent la majorité des faits actuellement connus. Il y a lieu, toutefois, d'envisager, dans chaque cas, la possibilité de l'alternative que nous signalons. Pendant longtemps encore, il sera le plus souvent difficile de se prononcer dans un sens ou dans l'autre : une spécificité très étroite (au moins au début), l'inaptitude de

(1) Ces *Annales*, 42, 1928, p. 1284.

M. Burnet attire l'attention sur le fait que dans le groupe des *Coli-typhiques-dysentériques*, ce sont les espèces qui ont perdu le plus de caractères primitifs du groupe qui se montrent les plus sensibles, *Medical Res. Coun. Bacteriol.*, 7, 1930, p. 497.

se multiplier sans qu'il y ait multiplication des cellules atteintes elles-mêmes, un rapport numérique simple et bas entre ces cellules et les éléments actifs, autant d'indications qui feront penser à l'origine cellulaire possible de ceux-ci.

### RÉSUMÉ.

1° Les données de Den Dooren de Jong sur la persistance de la fonction lysogène chez les cultures de *B. megatherium* issues de spores chauffées à 90°, sont pleinement confirmées. Des résultats analogues ont été obtenus avec des spores de *B. subtilis* expérimentalement contaminé par le bactériophage correspondant (confirmation des travaux de Cowles et de Adant).

2° Dans le cas de la souche lysogène, toutes les cultures obtenues à partir des spores chauffées (colonies isolées) sont douées de fonction lytique. Il en est autrement des souches expérimentalement contaminées : on obtient facilement à partir de spores chauffées, des cultures normales ne contenant pas de bactériophage.

3° Des expériences sur l'action des hautes pressions ont donné des résultats identiques à ceux des expériences de chauffage : les facteurs lysogènes (bactériophages) des spores résistent à des pressions qui détruisent sûrement les bactériophages libres et cela aussi bien pour les souches expérimentalement contaminées que pour les souches lysogènes.

4° Qu'il s'agisse des unes ou des autres, l'étude des propriétés antigènes des spores montre que celles-ci contiennent des bactériophages comme tels et non à l'état de puissance : dans les deux cas, il y a production d'anticorps pour les bactériophages correspondants.

5° Il résulte de cet ensemble de données qu'on ne peut plus conclure, comme le fait Den Dooren, à la production de bactériophages *de novo* dans les cultures lysogènes issues de spores chauffées. Les bactériophages de telles cultures dérivent, fort probablement, de bactériophages préexistants.

6° Le bactériophage du *B. megatherium* lysogène (filtrat de cultures en bouillon de ce germe) présente un titre relativement bas ( $10^3$ ,  $10^4$ ) par comparaison avec les lysats bactériophagiques ordinaires ( $10^8$ ,  $10^9$ ).



7° Les cultures de *B. megatherium* lysogène sur milieu solide (gélose sèche) ne contiennent pas de bactériophages libres.

8° De telles cultures contiennent des bactériophages intracellulaires. Ces bactériophages peuvent être mis en liberté en faisant dissoudre les bactéries par le lysozyme.

9° Sous l'action du lysozyme, les suspensions de *B. megatherium* cultivé sur gélose mettent en liberté, dans les conditions de nos expériences, autant d'éléments actifs (bactériophages) qu'elles donnent de colonies par ensemencement avant ce traitement. Cette donnée quantitative paraît difficilement compatible avec la notion du virus.

10° Les propriétés et le comportement des autolysines sont étudiés comparativement à ceux des bactériophages. Des exemples d'action de groupe sont apportés : lyse de sarcines par les autolysines de *Staphylocoque* ; lyse de la bactéridie carbonneuse par les autolysines de *B. subtilis*.

11° La lyse de bactéries par des antiseptiques formol, acide phénique, sublimé, cyanure de mercure est décrite et donnée comme exemple d'autolyse déclenchée par des substances dépourvues de toute action lytique propre. Comme l'autolyse transmissible (bactériophagie) l'autolyse par antiseptiques n'a lieu qu'en bouillon nutritif et fait défaut en eau physiologique.

12° Un essai est fait de traduire dans notre conception des *facteurs héréditaires* les données relatives aux souches lysogènes sporulées.

13° Cette conception pouvant être étendue à d'autres processus que la bactériophagie, des indications sont envisagées qui permettraient de faire le départ entre les processus infectieux à virus authentiques (inframicrobes) et ceux relevant de facteurs d'origine cellulaire.

#### LÉGENDE DE LA PLANCHE

FIG. 4-6. — Rapports numériques entre bactéries et bactériophages ; *a*, colonies fournies par des quantités déterminées (0 c. c. 1) de suspension de *B. megatherium* lysogène ; *b*, plages produites par les mêmes quantités de suspension de *B. megatherium* après traitement par le lysozyme.

(Photographies et photomicrographies de P. Jeantet.)

APPENDICE

**REMARQUES**

**SUR UNE PROPRIÉTÉ COMMUNE AUX GÈNES,**

**AUX PRINCIPES LYSOGÈNES**

**ET AUX VIRUS DES MOSAÏQUES**

par ANDRÉ LWOFF.

*(Laboratoire de Protistologie de l'Institut Pasteur.)*

Au cours d'une conversation sur les conséquences théoriques de la conception factorielle des principes lysogènes, nous avons été amené à discuter avec M. Wollman quelques notions relatives au mode d'action des gènes. M. Wollman veut bien nous permettre d'exprimer ces idées à la suite de son mémoire. Nous sommes heureux de profiter de cette opportunité pour les soumettre au lecteur tout en nous excusant du caractère purement spéculatif de cet exposé.

\*  
\* \*

Le développement des recherches sur les principes lysogènes a amené un certain nombre de chercheurs appartenant à des disciplines très diverses à homologuer les principes lysogènes aux facteurs ou aux gènes, supports de l'hérédité mendélienne. Cette conception peut heurter les esprits; notons simplement qu'elle a été émise par Wollman (1920-1925, etc.) et par H.-J. Muller (1922), reprise depuis par de Beer (1931), en renvoyant pour l'exposé de cette question aux mémoires et revues de Wollman.

Tout à fait indépendamment des conceptions théoriques sur la lyse transmissible, se développaient, pour les virus des mosaïques, des idées analogues. Duggar et Armstrong (1923, Euler (1931) admettent que ces virus sont des gènes modifiés

et Murphy (1933) arrive, pour les agents du sarcome de Rous qu'il appelle « mutagènes transmissibles », à la même conception. Il faut noter que Carrel (1925) avait conclu à l'analogie entre le principe de Twort et l'agent du sarcome de Rous et qu'il considère celui-ci comme un produit de la cellule.

Nous fondant sur ce qui précède, nous admettons que principes lysogènes et virus des mosaïques sont des gènes aberrants et nous envisagerons les propriétés des gènes aberrants et des gènes normaux par rapport à la division cellulaire.

On sait que l'action des gènes, ou tout au moins de certains d'entre eux, est limitée. Par exemple, l'analyse mendélienne a montré que les individus qui constituent la variété *aurea* (vert pâle) d'*Anthirrinum majus* sont des hétérozygotes. Le croisement *aurea-aurea* donne, en effet, trois types de descendants dont  $1/4$  sont vert franc,  $2/4$  vert pâle et  $1/4$  jaune pur, c'est-à-dire complètement dépourvus de chlorophylle. Les hybrides renferment donc deux facteurs allélomorphes, *Aur* permettant la synthèse de la chlorophylle, et *aur* ne permettant pas cette synthèse. Les produits du croisement qui portent *Aur-Aur* sont vert franc, *Aur-aur* vert pâle, et *aur-aur* jaune pur. Schématiquement, cela veut dire qu'une cellule qui possède deux gènes *Aur* contient deux fois plus de chlorophylle que celle qui n'en possède qu'un seul. Autre exemple : les hybrides d'*Hyosciamus niger* de *H. niger pallidum* n'ont que la moitié de la quantité d'anthocyane de *H. niger*. Dans ces cas, l'action (1) des gènes est quantitative.

Dans des conditions déterminées, un gène se montre donc capable de provoquer la synthèse d'une quantité déterminée, limitée, de substance (2). Ces faits méritent d'être envisagés de très près. On peut supposer que l'action du gène est limitée parce que la période de vie de la cellule entre deux divisions est elle-même limitée et que le gène, agissant avec une vitesse déterminée, ne peut, en un temps donné, manifester qu'une

(1) L'action des gènes dans une cellule est probablement limitée à une seule réaction dans une chaîne complexe de réactions nombreuses auxquelles toute la cellule participe. C'est donc arbitrairement que nous parlons de l'action d'un gène et que nous envisageons la synthèse d'un corps quelconque comme résultant de l'action d'un gène.

(2) Cette action limitée n'a été mise en évidence que pour un nombre relativement restreint de gènes.

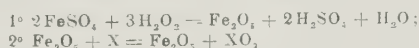


action donnée : deux gènes ont une action double d'un seul. Cette explication est valable pour les cellules en division. Mais elle perd sa valeur pour celles qui ont cessé de se diviser comme, par exemple, les cellules des tissus végétaux ayant effectué leur croissance. On peut admettre l'hypothèse que, dans ce cas, si l'action des gènes est limitée quantitativement, c'est que ceux-ci agissent non comme des catalyseurs, mais comme des *inducteurs* (1). En agissant, le gène passerait d'un état « actif » à un état « inactif ». Cette hypothèse peut paraître simpliste; elle mérite cependant examen.

C'est pendant la période de prédivision cellulaire, la période de « croissance de division », que doit se faire la « reproduction » des gènes, c'est-à-dire que le gène doit induire la formation d'un complexe qualitativement et quantitativement identique. Si nous admettons que le gène, au cours de la vie cellulaire, est passé d'un état actif à un état inactif, nous devons aussi admettre qu'il sera réactivé au moment de la division, puisque les cellules-filles possèdent des gènes actifs. Il y aurait ainsi dans la cellule deux catégories d'éléments qui agiraient de façon différente : les uns, les gènes, considérés souvent comme les générateurs des enzymes cellulaires, qui seraient des inducteurs; les autres, les enzymes, qui sont des catalyseurs. Et les gènes, en agissant, passeraient, comme les inducteurs, d'un état actif à un état inactif, la période de réactivation étant la période de prédivision cellulaire qui s'accompagne, on le sait (Rapkine, 1931), d'importants changements chimiques.

Revenons aux principes lysogènes. Twort avait remarqué,

(1) Pour préciser, nous donnons un exemple d'induction. L'oxydation par le fer bivalent en présence d'une très petite quantité d'eau oxygénée répond à la formule :



Dans une première phase, le fer bivalent ( $\text{FeSO}_4$ ), inducteur, a été oxydé et amené à l'état de fer pentavalent ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ). Dans une seconde phase, le fer pentavalent oxyde l'accepteur X et est réduit à l'état trivalent ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) stable, *inactif*. La réaction ne prendra l'allure catalytique que si le fer trivalent est réduit à l'état bivalent, *actif*, ce qui a lieu seulement en présence d'un excès d'eau oxygénée. Dans la cellule, les oxydations par le fer sont une catalyse et le passage de l'état bivalent à l'état trivalent se fait plusieurs fois par seconde. Ce schéma est donc donné uniquement comme un *exemple d'induction* et n'a nullement la prétention de représenter le fonctionnement des gènes.

dès 1915, que l'action de ceux-ci est plus rapide et plus complète sur des cultures jeunes, en pleine multiplication, que sur des cultures âgées. Bordet et Jaumain ont montré depuis que les principes lysogènes n'agissent que sur des bactéries alimentées, et Wollman a pu mettre en évidence que, même en bouillon peptoné, la lyse des bactéries et la multiplication des facteurs lysogènes ne se fait qu'à des températures compatibles avec la multiplication des bactéries elles-mêmes, c'est-à-dire que la multiplication et l'action des principes lysogènes est liée à la division des bactéries. La lyse des germes tués qui a été parfois observée n'est qu'une lyse secondaire qui n'est pas provoquée directement par le bactériophage.

Les virus des mosaïques nous montrent des faits du même ordre. Ces virus ne se multiplient et ne produisent de lésions que dans des tissus renfermant des cellules en division (1). On peut donc dire que la reproduction et l'activité des virus des mosaïques est fonction de la division cellulaire comme la reproduction et l'activité des principes lysogènes est fonction de la division des bactéries.

Tout se passe comme si principes lysogènes et virus des mosaïques existaient sous deux états, actif et inactif, et que le passage de l'état inactif à l'état actif était lié à la division cellulaire. En admettant les conceptions de Wollman et de Duggar et Armstrong, nous pouvons considérer que si l'activité des « virus-gènes » est liée, comme celle des gènes normaux, à la division cellulaire, c'est que leurs natures fondamentales sont identiques.

Un autre phénomène doit être évoqué ici. Les travaux de l'école de Virtanen, tout particulièrement ceux de Karström, ont mis en évidence chez les bactéries deux sortes d'enzymes : les enzymes « constitutifs » qui existent dans la bactérie, quel que soit le milieu de culture, et les enzymes « adaptatifs » qui ne se forment que si le milieu renferme un substrat déterminé. Par exemple, le *Betacoccus arabinosaceus* qui fermente le glucose, quel que soit le milieu de culture (avec ou sans glucide), ne peut fermenter le lactose que si le milieu où il s'est déve-

(1) Dans des cas tout à fait exceptionnels, certains semblent pouvoir se multiplier dans des cellules au repos.

loppé contenait du lactose. Or, fait très suggestif, ces enzymes adaptatifs ne se forment pas si on laisse les bactéries en contact avec le substratum favorable en l'absence d'aliment azoté et apparaissent quelques heures après l'adjonction d'un aliment azoté. La formation des enzymes adaptatifs est donc très probablement liée à la multiplication microbienne (Karström, 1930). L'activité des « facteurs » responsables de la synthèse de ces enzymes serait donc conditionnée : 1° par la présence d'un substratum convenable; 2° par la multiplication cellulaire. Ce fait, ajouté aux autres, montre que la relation entre division et activation se présente comme un phénomène d'une grande importance et probablement même d'une grande généralité.

En résumé, l'action quantitativement limitée des gènes peut s'expliquer par l'hypothèse que les gènes agissent dans la cellule non pas comme des catalyseurs, mais comme des inducteurs à réactivation cyclique; le gène, du fait de son activité, passerait d'un état actif à un état inactif, la réactivation ayant lieu au moment de la période de prédivision. Cette hypothèse rend parfaitement compte des propriétés des principes lysogènes et de certains virus des mosaïques dont l'activité est conditionnée par la division cellulaire. Cette communauté de réactions vis-à-vis de la division cellulaire, qui tient sous sa dépendance la reproduction et l'activation des gènes, des virus des mosaïques et des principes lysogènes, ne doit pas être considérée, pensons-nous, comme l'expression d'un simple phénomène de convergence ou envisagée comme une propriété commune à des « agents » sans relation fondamentale. Elle est pour nous une expression de la parenté réelle des « virus-gènes » et des gènes normaux et nous considérons cette similitude physiologique comme un argument important en faveur de la conception de Wollman et de Duggar et Armstrong.

#### TRAVAUX CITÉS

- DE BEER (G.-R.), The analogy between the bacteriophage and the mendelian factor or gene, in *Microbes and Ultramicrobes*, par A.-D. Gardner, Londres, 1931.



- VON EULER (H.), Recherches chimiques sur l'action de deux virus des végétaux. *II<sup>e</sup> Congrès de Pathologie comparée*, 2, 1931, p. 459.
- KARSTRÖM (H.), Ueber Enzymbildung in Bakterien. *Thèse*, Helsinki, 1930.
- MULLER (H.-J.), Variation due to change in the individual gene. *American Naturalist*, 56, 1922, p. 32.
- RAPKINE (L.), Sur les processus chimiques au cours de la division cellulaire. *Annales Physiol. et Physicochimie biol.*, 7, 1931, p. 382.
- WOLLMANN (E. et M<sup>me</sup> E.), Recherches sur le phénomène de Twort-d'Hérelle; IV<sup>e</sup> mémoire. Ces *Annales*, 56, 1936, p. 1374.

# RECHERCHES SUR LES ANTIGÈNES DES VENINS ET LES ANTICORPS DES SÉRUMS ANTIVENIMEUX

DEUXIÈME MÉMOIRE

## VENIN DE *CERASTES CORNUTUS* ET SÉRUMS ANTIVIPÉRINS (*C. CORNUTUS*)

par E. CÉSARI et PAUL BOQUET.

En suivant le plan de travail déjà exposé et à l'aide des techniques expérimentales précédemment utilisées pour mesurer l'activité des éléments antigéniques du venin de *Vipera aspis* et des anticorps du sérum antivenimeux correspondant (v. notre premier mémoire : ces *Annales*, septembre 1935), nous avons continué nos recherches sur le venin d'un serpent de l'Afrique du Nord, appartenant également à la famille des *Vipéridés*, *Cerastes cornutus* (Céraste d'Égypte ou Vipère à corne, et le sérum antivenimeux obtenu en partant de ce venin. Nos investigations ont été complétées, cette fois, par l'étude de l'action du sérum antivipérin aspic sur les antigènes du venin de Céraste et, inversement, du sérum antivipérin céraste sur les antigènes du venin de la Vipère aspic.

### 1° LES ANTIGÈNES DU VENIN DE *C. CORNUTUS*

L'échantillon étalon qui nous a servi pour les recherches exposées ci-après a été prélevé sur une provision de venin de Céraste que nous devons à l'obligeance du Dr Etienne Sergent, de l'Institut Pasteur d'Alger. Le venin recueilli sur des reptiles vivants, capturés en Algérie au cours de l'année 1934, avait été desséché aussitôt la récolte et conservé depuis, en tubes scellés, à l'obscurité.

#### Mesure de la toxicité *in vivo*.

Pour ne pas dilapider la quantité limitée de venin étalon dont nous disposions, nous avons dû nous abstenir d'étudier les modifications apportées par le chauffage aux propriétés toxiques du venin de Céraste.

## EXPÉRIENCES SUR LE LAPIN.

*Administration du venin par la voie sanguine.* — L'injection intraveineuse de 0 milligr. 5 de venin par kilogramme de poids vif amène la mort en une à deux minutes. Avec 0 milligr. 45 par kilogramme, le lapin éprouvé ne manifeste aucun signe clinique d'envenimation.

A l'autopsie des lapins qui succombent, on constate que les mouvements du cœur ne sont pas abolis, tantôt les battements rythmés persistent, tantôt le muscle cardiaque présente encore des trémulations. On trouve une pelote de fibrine dans l'oreillette droite; les veines cave et porte sont thrombosées. Les viscères abdominaux paraissent plus ou moins congestionnés.

On retrouve donc chez les lapins auxquels on administre le venin de Céraste par la voie veineuse, le phénomène déjà noté à propos du venin de la Vipère d'Europe, c'est-à-dire : ou la mort brutale, en quelques minutes, par coagulation massive du sang, ou rien.

*Administration du venin par la voie sous-cutanée.* — Sous la peau, il faut injecter au moins 5 milligrammes de venin par kilogramme pour tuer l'animal. La mort survient en dix à douze heures. A l'autopsie, on observe une nappe d'infiltration hémorragique qui s'étend dans le tissu cellulaire sous-cutané assez loin du point d'injection. L'intestin est légèrement hyperémié. Le sang est coagulé.

Les doses moindres ne déterminent que la formation d'une tuméfaction locale, molle et hémorragique, s'accompagnant parfois, chez certains sujets, d'une escharification tégumentaire.

## EXPÉRIENCES SUR LE COBAYE (animaux de 420 à 450 grammes).

*Administration du venin par la voie sanguine.* — L'injection de 0 milligr. 5 de venin de Céraste dans la veine jugulaire tue le cobaye en moins de deux minutes. Les doses comprises entre 0 milligr. 4 et 0 milligr. 3 amènent la mort en un espace de temps qui peut varier de une demi-heure à trois heures. A partir de 0 milligr. 2, les suites de l'envenimation ne sont pas constamment fatales, quoique des doses de 0 milligr. 1 et



0 milligr. 05 puissent encore se montrer susceptibles de déterminer la mort de certains sujets en une dizaine de minutes.

Lorsque la mort n'est pas immédiate (doses comprises entre 0 milligr. 4 et 0 milligr. 3), le cobaye chancelle, tombe sur le flanc, reste étendu, inerte, mou, respirant de plus en plus faiblement, et meurt dans cet état de curarisation sans qu'on s'aperçoive du passage de la vie à trépas. Jusqu'à la fin, le réflexe cornéen est conservé; les pattes ne réagissent pas au pincement.

A l'ouverture du cadavre, le cœur paraît arrêté, mais il est encore excitable et les pulsations de l'artère pulmonaire restent nettement perceptibles. L'estomac, la rate, l'intestin grêle sont injectés; le myocarde est parsemé de suffusions sanguines. On ne trouve pas de caillot dans le cœur, mais il en existe dans la veine cave et la veine porte. Le sang retiré du cœur se coagule lentement; le sérum est clair.

Si la quantité de venin introduite dans la veine ne dépasse pas 0 milligr. 2, les cobayes présentent des signes de parésie de l'arrière-train, leur respiration dyspnéique s'accompagne souvent d'un soubresaut du flanc, puis, ou les animaux succombent brusquement au bout d'une dizaine de minutes, ou bien les symptômes se dissipent rapidement et l'animal se remet.

Ici, dans les cas mortels, l'autopsie montre une vive congestion des viscères abdominaux. Les mouvements du cœur abolis peuvent être ranimés par les excitations. On ne rencontre de caillot ni dans le cœur, ni dans les veines; le sang est incoagulable.

*Administration du venin par la voie sous-cutanée.* — Une dose de 6 milligrammes, au moins, de venin est nécessaire pour tuer le cobaye par la voie sous-cutanée. La mort survient en une douzaine d'heures. Localement, les lésions consistent en une infiltration hémorragique avec escharification de la peau. Tous les organes de la cavité abdominale sont injectés. On note la présence de caillots dans le cœur.

Des quantités plus faibles de venin ne produisent qu'un œdème hémorragique avec nécrose cutanée plus ou moins étendue, selon la dose. Au-dessous d'un milligramme, l'eschare fait défaut.

## EXPÉRIENCES SUR LA SOURIS (18 à 20 grammes).

*Administration du venin par la voie sanguine.* — Entre 0 milligr. 1 et 0 milligr. 04 de venin, les souris meurent habituellement en une à deux minutes; quelques-unes peuvent cependant survivre une demi-heure. Avec 0 milligr. 02, les animaux résistent.

Les souris qui ont succombé ne montrent à l'autopsie qu'une légère congestion du poumon et de l'intestin.

*Administration du venin par la voie sous-cutanée.* — Il faut introduire 0 milligr. 3 de venin sous la peau pour tuer la souris en une dizaine d'heures. Des doses supérieures (1 milligramme) ne provoquent pas la mort dans un délai plus court. Les cadavres des sujets qui ont péri présentent une infiltration hémorragique du tissu conjonctif sous-cutané et quelques pétéchies sur le péritoine.

Mesure du pouvoir coagulant *in vitro*.

Le venin de *Cerastes cornutus* se montre doué, comme le venin de *Vipera aspis*, d'un fort pouvoir coagulant; par contre, ses propriétés anticoagulantes sont moins accusées.

TABLEAU I.

NUMÉROS DES TUBES	DOSES de venin en milligrammes	1/4 D'HEURE	1/2 HEURE	1 HEURE
1 . . . . .	0,0005	0	c	C
2 . . . . .	0,001	c	c	C
3 . . . . .	0,0025	C	C	C
4 . . . . .	0,005	C	C	C
5 . . . . .	0,01	C	C	C
6 . . . . .	0,025	C	C	C
7 . . . . .	0,05	C	C	C
8 . . . . .	0,1	C	C	C
9 . . . . .	0,25	C	C	C
10 . . . . .	0,5	C	C	C
11 . . . . .	1	C	C	C
12 . . . . .	2,5	C	C	C
Témoin (1). . . . .		0	0	0

(1) C, au bout de deux heures.  
0, absence de coagulation; c, coagulation partielle; C, coagulation totale.

Le tableau précédent (tableau I) indique les limites de l'action coagulante obtenue, dans les conditions expérimentales adoptées pour en effectuer la mesure, sur le plasma de Cheval choisi comme test (v. notre précédent mémoire).

On voit qu'il faut employer 0 milligr. 0025 de venin de Céraste pour provoquer, en un quart d'heure, la coagulation de 2 cent. cubes de plasma de Cheval; c'est dire que, vis-à-vis du plasma de Cheval, notre échantillon étalon se comporte, à très peu de chose près, comme l'échantillon étalon de venin de Vipère étudié dans notre premier travail.

L'effet anticoagulant qui, avec le venin de Vipère, se manifestait à partir de la dose de 0 milligr. 5, n'apparaît pas ici et il faut atteindre, avec notre échantillon de venin de Céraste, la dose de 7 milligr. 5 pour le mettre en évidence dans le tube à réaction.

Contrairement à ce que nous avons constaté pour le venin de Vipère, le plasma de Cheval est plus sensible à l'action du venin de Céraste que les plasmas de Bœuf et de Mouton.

A partir de 60°, le chauffage affaiblit progressivement le pouvoir coagulant du venin de Céraste, lequel est presque entièrement aboli à la température de 80°.

### Mesure de l'action hémolytique.

Nous avons signalé, à propos du venin de Vipère, que l'activité hémolytique de la lysocithine engendrée au contact du sérum de Cheval s'exerçait avec beaucoup plus d'intensité à la température de la glace fondante qu'à la température de l'étuve. Il en est de même pour le venin de *Cerastes cornutus*.

Les chiffres qui donnent la mesure du pouvoir hémolytique du venin de Céraste vis-à-vis des globules rouges de Cheval, de Bœuf et de Mouton figurent dans le tableau suivant (tableau II).

On constate qu'il faut 0 milligr. 00035 de venin de Céraste pour engendrer la quantité de lysocithine nécessaire pour hémolyser 1 cent. cube de globules rouges de Cheval, quantité un peu supérieure à la dose de venin de Vipère capable de produire le même effet.

Les hématies de Bœuf se montrent presque aussi sensibles que celles de Cheval à l'action hémolytique du venin de Céraste :

TABLEAU II.

NUMÉROS DES TUBES	DOSES de venin en milligrammes	CONTACT VENIN + SÉRUM 1 heure à 37° avant l'addition des globules rouges. Résultats après 30 minutes de séjour 0°		
		Cheval	Bœuf	Mouton
1 . . . . .	5	H	0	0
2 . . . . .	3,5	H	0	0
3 . . . . .	1,5	H	0	0
4 . . . . .	0,5	H	0	0
5 . . . . .	0,35	H	0	0
6 . . . . .	0,15	H	h	0
7 . . . . .	0,05	H	H	0
8 . . . . .	0,035	H	H	0
9 . . . . .	0,015	H	H	0
10 . . . . .	0,005	H	H	0
11 . . . . .	0,0035	H	H	0
12 . . . . .	0,0015	H	H	0
13 . . . . .	0,0005	H	H	0
14 . . . . .	0,00035	H	h	0
15 . . . . .	0,00015	h	0	0
16 . . . . .	0,00005	0	0	0
17 . . . . .	0,000035	0	0	0
18 . . . . .	0,000015	0	0	0
Témoin . . . . .	0	0	0	0

H, hémolyse totale; h, hémolyse partielle; 0, absence d'hémolyse.

toutefois, les globules de Bœuf révèlent ici un effet antihémo-lytique, se manifestant dans les tubes contenant une dose de venin de *Céraste* égale ou supérieure à 0 milligr. 15 (1).

Quant aux hématies de Mouton, elles paraissent complètement réfractaires à la lysocithine formée par le venin de *Cerastes cornutus* aux dépens des lipoides du sérum de Cheval.

## 2° LES ANTICORPS DU SÉRUM ANTIVIPÉRIN *C. CORNUTUS*

Nous avons utilisé, pour l'étude des propriétés antitoxiques et antidiastases du sérum antivenimeux préparé avec le

(1) La résistance des hématies aux fortes concentrations de venins, signalée par Weir-Mitchell et Stewart (1897) à propos du venin de *Crotale*, puis par Stephens et Myers (1898) à propos du venin de *Cobra*, a fait l'objet de recherches de la part de Noguchi (1909) qui attribue ce phénomène à la formation d'un composé insoluble.



venin de Céraste, les sérums de quatre chevaux hyperimmunisés ou en cours d'immunisation qui, à la date de la saignée ayant fourni les sérums étudiés, avaient respectivement reçu, sous la peau, en tout :

Les chevaux 900 et 902, 2 gr. 035;

Le cheval 895, 2 gr. 603;

Le cheval 893, 13 gr. 878 de venin de *Cerastes cornutus*.

### Détermination du pouvoir antitoxique.

Les expériences de titrage *in vivo* ont été faites uniquement sur le Lapin. On injectait dans la veine des animaux, après une demi-heure de contact à la température de l'étuve, un mélange de sérum et de venin contenant, pour une quantité de venin de Céraste calculée sur la base de huit doses mortelles par kilogramme d'animal, soit 4 milligrammes (1), des volumes variables du sérum antivenimeux à titrer.

#### 1° Action du sérum antivipérin Céraste sur le venin de *Cerastes cornutus*.

La dose de sérum nécessaire et suffisante pour neutraliser, vis-à-vis du Lapin éprouvé par voie veineuse, un milligramme de venin de *Cerastes cornutus*, a été, pour chacun des sérums antivenimeux soumis au titrage, de :

Pour le sérum du cheval n° 895 : 0 c. c. 4 ;

Pour le sérum du cheval n° 902 : 0 c. c. 5 ;

Pour le sérum du cheval n° 900 : 0 c. c. 6 ;

Pour le sérum du cheval n° 893 : 1 cent. cube.

Comme nous l'avons déjà signalé à l'occasion des expériences effectuées pour déterminer la mesure du pouvoir antitoxique des sérums antivipérins *aspis* envers le venin de *Vipera aspis* (V. premier mémoire, p. 320), nous devons également noter ici que certains lapins qui reçoivent dans la veine un mélange dont les huit doses mortelles de venin de Céraste

(1) Nous avons dû réduire, ici, à huit doses mortelles au lieu des dix utilisées pour les titrages des sérums antivipérins *aspis* la quantité de venin injectée, afin de ne pas gaspiller la provision limitée de venin de Céraste qui nous servait d'échantillon étalon.

sont incomplètement neutralisées par le volume de sérum antivenimeux ajouté, meurent au bout de plusieurs heures, sans que les animaux qui succombent dans ces conditions montrent à l'autopsie, de caillot sanguin dans le cœur ou les vaisseaux.

En utilisant le mode de cotation adopté dans notre précédent travail pour exprimer la puissance antitoxique des sérums antivipérins, l'unité venimeuse du venin de *Cerastes cornutus* (gramme Lapin-veine) étant représentée par 0 milligr. 0005.

Le sérum 895 titrerait : 5.000 unités antivenimeuses.

Le sérum 902 titrerait : 4.000 unités antivenimeuses.

Le sérum 900 titrerait : 3.300 unités antivenimeuses.

Le sérum 893 titrerait : 2.000 unités antivenimeuses.

## 2° Action du sérum antivipérin aspic sur le venin de *Cerastes cornutus*.

Le sérum antivipérin aspic n° 862, qui s'était montré le plus actif des sérums antivenimeux étudiés dans notre premier mémoire à l'égard des effets toxiques du venin de vipère, neutralisant 1 milligramme de ce venin à la dose de 0 c. c. 3, est incapable de neutraliser 1 milligramme de venin de Céraste, à la dose de 3 cent. cubes, dans les conditions expérimentales décrites ci-dessus, c'est-à-dire lorsque la quantité de venin contenu dans le mélange injecté dans la veine du lapin représente huit doses minima mortelles.

C'est dire que les sérums antivipérins aspis ne peuvent être pratiquement utilisés contre les morsures de la Céraste à corne; cela ne saurait signifier cependant que ces sérums sont totalement dépourvus d'action antitoxique vis-à-vis du venin de ce serpent. Si faible soit-elle, cette action se révèle, en effet, lorsque, au lieu d'injecter au lapin un réactif contenant plusieurs fois la dose minima mortelle de venin, on lui administre un mélange venin-sérum ne renfermant qu'une seule dose mortelle de venin de Céraste, soit 0 milligr. 5 par kilogramme d'animal.

En de telles conditions, on voit le lapin d'épreuve résister à l'injection intraveineuse d'un mélange renfermant, pour une dose minima mortelle de venin, 10 cent. cubes de sérum anti-

vipérin aspic n° 862 (1). Mais la même dose de sérum est impuissante à empêcher la mort de l'animal lorsque la quantité de venin de Céraste introduite dans le mélange correspond à deux doses mortelles, soit 1 milligramme par kilogramme. Ceci revient à dire que 10 cent. cubes du sérum antivipérin aspic 862 ont neutralisé une dose minima mortelle de venin de Céraste ou une fraction de cette dose, puisque, nous l'avons souligné, la dose de 0 milligr. 5 est la limite au-dessous de laquelle les lapins ne succombent jamais.

Dans le système d'évaluation numérique du pouvoir antivenimeux que nous avons adopté, le sérum antivipérin aspic 862, dont le titre antitoxique, vis-à-vis du venin de *Vipera aspis*, était de 9.500 unités antivenimeuses, possède, au regard du venin de Céraste, un titre antitoxique égal ou inférieur à 200 unités antivenimeuses.

### 3° Action du sérum antivipérin Céraste sur le venin de *Vipera aspis*.

Le sérum 895, qui s'est révélé le meilleur des sérums antivipérins Céraste dont nous disposons, d'après les chiffres donnés plus haut, neutralisant 1 milligramme de venin de Céraste à la dose de 0 c. c. 4, n'arrive pas à neutraliser 1 milligramme de venin de Vipère aspic à la dose de 3 cent. cubes, dans les conditions expérimentales exposées dans notre premier mémoire, c'est-à-dire lorsque la quantité de venin contenue dans le mélange injecté au lapin représente dix fois la dose minima mortelle.

Cette constatation exclut la possibilité d'envisager l'emploi du sérum antivipérin Céraste contre les morsures de la Vipère aspic, mais elle n'autorise pas à soutenir que le sérum antivipérin Céraste est complètement démuní d'anticorps dirigés contre les antigènes toxiques du venin de vipère. En effet, ici encore, si on procède au titrage en mettant le sérum antivenimeux dont on veut mesurer l'action antitoxique, non plus au contact de dix doses mortelles de venin, mais seulement d'une,

(1) Nous nous sommes assurés, cela va sans dire, que les lapins recevant un mélange composé d'une dose mortelle de venin et de 10 cent. cubes de sérum normal de cheval meurent dans le délai habituel.

deux ou trois doses mortelles, on constate que le sérum antivipérin Céraste jouit de propriétés antitoxiques indéniables à l'égard du venin de *Vipera aspis*.

C'est ainsi que les lapins qui reçoivent, dans la veine, le mélange de trois doses mortelles de venin de Vipère, soit 1 milligr. 05 par kilogramme, et des doses de sérum représentant, par milligramme de venin, 5 cent. cubes ou 6 cent. cubes du sérum antivipérin Céraste 895, succombent en moins de dix minutes, tandis qu'ils résistent à l'injection du mélange comportant 7 cent. cubes du sérum 895 par milligramme de venin. Traduites en unités antivenimeuses, ces données montrent que le sérum antivipérin Céraste 895, dont le pouvoir est de 5.000 unités vis-à-vis du venin de Céraste, titre, par rapport au venin de *Vipera aspis*, 570 unités.

REMARQUES. — Nous avons répété, à propos du venin de Céraste, observation déjà faite au sujet du mécanisme de la mort des lapins qui reçoivent du venin de Vipère dans la veine, que l'administration du venin par la voie sanguine provoque, à partir d'une certaine dose, la mort en quelques minutes des animaux d'expérience par suite de l'effet coagulant exercé par le venin sur le sang circulant et qu'en deça du seuil représenté par cette dose limite, les sujets éprouvés ne paraissent ressentir aucun trouble. Ceci montre que l'élément du venin responsable de la mort rapide du lapin injecté par la voie veineuse est le facteur coagulant.

Il a été dit, d'autre part, que les lapins qui succombent à la suite de l'injection intraveineuse d'un mélange comportant huit ou dix fois la dose mortelle de venin (Céraste ou Aspic), dont la toxicité n'a pas été complètement abolie par le sérum homologue, meurent parfois plus tardivement, sans que l'on relève à l'autopsie, en pareille circonstance, des vestiges de coagulation sanguine, les animaux éprouvés montrant alors seulement les altérations hémorragiques, faisant défaut dans les cas de mort immédiate, et caractérisant les effets pathogènes habituels des venins de Vipéridés.

Or, il est à remarquer que dans les expériences effectuées pour déterminer le pouvoir antitoxique du sérum antivipérin Céraste vis-à-vis du venin de vipère ou, inversement, le pou-



voir antitoxique du sérum antivipérin aspic vis-à-vis du venin de Céraste, les lapins d'épreuve qui ont succombé à la suite de l'injection intraveineuse d'un mélange renfermant une, deux ou trois doses mortelles de venin, non entièrement neutralisées par la quantité de sérum hétérologue ajoutée, meurent constamment en moins de dix minutes avec des caillots dans le cœur et des thromboses de la veine cave et de la veine porte.

On est donc en droit de penser que la légère action antitoxique hétérologue exercée par les sérums antivipérins aspic à l'égard du venin de Céraste, comme celle exercée par le sérum antivipérin Céraste envers le venin de la Vipère aspic, procède uniquement de l'effet anticoagulant de ces sérums, lequel tient à la présence d'un anticorps que les épreuves *in vitro* rapportées ci-après vont nous montrer en effet dépourvu de spécificité quant aux venins envisagés dans ce travail.

#### Détermination du pouvoir anticoagulant.

Les sérums antivipérins Céraste neutralisent l'action coagulante du venin de *Cerastes cornutus* sur le plasma de cheval; ils neutralisent également, quoique à un moindre degré, l'effet coagulant du venin de *Vipera aspis*.

Par la méthode de titrage dont nous avons donné précédemment la technique, nous avons obtenu, en faisant agir les sérums antivipérins Céraste, d'une part, sur le venin de Céraste et, d'autre part, sur le venin de Vipère, les résultats indiqués dans le tableau suivant (tableau III).

D'un autre côté, le sérum antivipérin aspic n° 875 pourvu de l'activité anticoagulante à l'égard du venin de Vipère (v. premier mémoire) empêche, au même titre, la coagulation due au venin de Céraste.

#### Détermination du pouvoir antihémoxytique.

Les sérums antivipérins Céraste entravent la formation de la lysocythine engendrée par le venin de *Cerastes cornutus* agissant sur le sérum de Cheval; ils exercent le même effet empê-

TABLEAU III.

DOSES de sérum antipépérin Céraste mises en contact avec VII gouttes de venin au 1/10.000 avant l'addition de plasma de Cheval (en cent. cubes)		RÉSULTAT APRÈS TRENTE MINUTES DE SÉJOUR A L'ÉTUVE							
		Sérum 893 sur		Sérum 895 sur		Sérum 900 sur		Sérum 902 sur	
		venin de Céraste	venin d'Aspic	venin de Céraste	venin d'Aspic	venin de Céraste	venin d'Aspic	venin de Céraste	venin d'Aspic
1 . . . . .	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0
2 . . . . .	0,07	0	0	0	0	0	0	0	0
3 . . . . .	0,03	0	c	0	0	0	C	0	C
4 . . . . .	0,01	0	c	0	c	0	C	0	C
5 . . . . .	0,007	0	c	0	C	c	C	c	C
6 . . . . .	0,003	0	c	0	C	c	C	C	C
7 . . . . .	0,001	0	c	0	C	C	C	C	C
8 . . . . .	0,0007	0	c	C	C	C	C	C	C
9 . . . . .	0,0003	0	c	C	C	C	C	C	C

C, coagulation massive; c, coagulation partielle; 0, absence de coagulation.

chant en ce qui concerne la fonction lysoecythinogène du venin de *Vipera aspis*.

Le sérum antipépérin aspic 874, qui neutralise l'action hémolytique du venin de la Vipère commune (v. premier mémoire), se comporte de même façon à l'égard des propriétés hémolytiques du venin de Céraste.

Ces constatations découlent d'expériences effectuées suivant la technique antérieurement décrite et que l'on trouvera groupées dans le tableau ci-dessous (tableau IV) :

#### Pouvoirs précipitant et floculant des sérums antipépérins.

Les expériences de précipitation et de floculation entreprises avec les sérums antipépérins Céraste, de même que celles rapportées dans le travail ayant trait au venin de Vipère et au sérum antipépérin aspis, n'ont apporté aucune donnée susceptible d'interprétation.

D'ailleurs, ainsi qu'on le verra dans le tableau ci-après, qui résume nos tentatives, les sérums antipépérins Céraste donnent des précipitations aussi bien avec les solutions de venin de

TABLEAU IV.

NATURE DES VENINS	DOSES de sérum antipépérin mises en contact pendant une heure à 37° avec V <sub>g</sub> de venin au 1/50.000 avant l'addition des globules rouges de cheval (en cent. cubes)	RÉSULTATS APRÈS UNE DEMI-HEURE DE SÉJOUR A 0°				
		Sérums antipépérins Céraste				Sérum antipépérin Aspic
		n° 895	n° 902	n° 900	n° 893	n° 874
Venin de Céraste	0,005 . . . . .	0	0	0	0	0
	0,0025 . . . . .	0	0	0	0	0
	0,001 . . . . .	0	h	h	h	0
	0,0007 . . . . .	0	h	h	h	h
	0,0003 . . . . .	II	II	II	II	h
	0,0001 . . . . .	II	II	II	II	h
	0,00007 . . . . .	II	II	II	II	h
	0,00003 . . . . .	II	II	II	II	II
Venin de Vipère aspic	0,005 . . . . .	0			0	0
	0,0025 . . . . .	0			0	0
	0,001 . . . . .	h			h	0
	0,0007 . . . . .	h			h	0
	0,0003 . . . . .	h			II	0
	0,0001 . . . . .	h			II	0
	0,00007 . . . . .	h			II	h
	0,00003 . . . . .	II			II	II
Témoins . . . . .		1, X <sub>g</sub> sérum normal + V <sub>g</sub> venin Céraste = II. 2, X <sub>g</sub> sérum normal + V <sub>g</sub> venin V. aspic = II.				
II, hémolyse totale; h, hémolyse partielle; 0, absence d'hémolyse.						

*Cerastes cornutus* qu'avec les solutions de venin de *Vipera aspis*. Qui mieux est, la floculation apparaît plus souvent dans les mélanges où les sérums antipépérins Céraste sont mis au contact des antigènes du venin de Vipère que dans ceux où ils sont appelés à agir sur les antigènes du venin homologue.

..

Les conclusions émises à la suite de notre première étude, à savoir que la valeur antitoxique des sérums antipépérins aspic ne pouvait être appréciée par la détermination de leur pouvoir anticoagulant, antihémolytique, précipitant ou floculant, se trouvent confirmées point par point par les recherches portant sur les sérums antipépérins Céraste exposées ci-dessus.

Les titrages effectués au cours de cette deuxième série d'expériences montrent en effet que la force antitoxique des sérums antivipérins Céraste n'est pas forcément en parallélisme avec leur puissance empêchante à l'égard de la propriété coagulante ou hémolytique du venin de *Cerastes cornutus*, non plus qu'avec les indications fournies par les réactions de précipitation ou de floculation.

TABLEAU V.

DOSES DE SÉRUM antivipérin (en cent. cubes)	DOSES de venin (en grammes)	RAPPORT des concentrations venin sérum	SÉRUMS ANTIVIPÉRINS CÉRASTE							
			n° 900 sur venin de		n° 902 sur venin de		n° 893 sur venin de		n° 895 sur venin de	
			Céraste	Aspic	Céraste	Aspic	Céraste	Aspic	Céraste	Aspic
0,5 . . . . .	0,04	4/0	0	p	0	0	0	0	0	0
0,25 . . . . .	0,01	1/75	0	p	0	0	0	0	0	0
1 . . . . .	0,01	1/100	0	p	p	0	0	p-Fi	0	p-Fi
1 . . . . .	0,0075	1/133	p	p	p	p	0	0	0	0
1 . . . . .	0,0050	1/200	p	p	p	p	0	0	p	0
1 . . . . .	0,0025	1/400	P	P	p	p	p	0	p	0
1 . . . . .	0,001	1/1.000	P	P	0	p	p	0	p	0
1 . . . . .	0,00075	1/1.333	P-Fi	P-Fi	0	0	0	0	0	0
1 . . . . .	0,0005	1/2.000	P	P	0	0	0	0	0	0
1 . . . . .	0,00025	1/4.000	P	p	0	p	0	0	0	0
1 . . . . .	0,0001	1/10.000	P	p	0	p	0	0	0	0
1 . . . . .	0,000075	1/13.333	p	0	0	p-Fi	0	0	0	0
1 . . . . .	0,00005	1/20.000	0	0	0	p	0	0	0	0
1 . . . . .	0,000025	1/40.000	0	0	0	0	0	0	0	0

p, léger trouble; P, précipitation nette; Fi, floculation initiale.

Il nous paraît donc établi que, dans l'état actuel de nos connaissances, seul le titrage *in vivo* des sérums antivipérins permet de juger et de mesurer justement leur activité antivénimeuse, autrement dit leur valeur thérapeutique.

Le sérum antivipérin Céraste neutralise complètement la toxicité du venin de *Cerastes cornutus* et, dans une mesure beaucoup plus faible, annihile les effets pathogènes dus au poison coagulant contenu dans le venin de *Vipera aspis*.

Inversement, le sérum antivipérin aspic neutralise entièrement la toxicité du venin de *Vipera aspis* et, à un degré moindre, exerce une action antagoniste vis-à-vis du



poison coagulant contenu dans le venin de *Cerastes cornutus*.

Les sérums antivipérins Céraste et antivipérins aspic entravent indifféremment *in vitro*, comme ils paraissent le faire *in vivo*, les phénomènes de coagulation plasmatique engendrés soit par le venin de vipère, soit par le venin de Céraste. De même, les deux sortes de sérums antivipérins, Céraste et aspic, empêchent, *in vitro*, les processus hémolytiques provoqués par l'un ou l'autre de ces deux venins.

On doit donc considérer, en première approximation, que les antigènes représentant les facteurs toxiques caractéristiques (hémorragine) des venins de *Vipera aspis* et de *Cerastes cornutus* sont différents, tandis que les antigènes liés aux éléments coagulant et hémolytique de ces venins sont identiques.

La communauté d'antigènes révélée par les réactions croisées de précipitation et de floculation observées dans les mélanges de sérums antivipérins Céraste et les solutions de venins de *Vipera aspis* ou de *Cerastes cornutus*, doit tenir à la similitude du couple antigénique des pseudo-thrombines et des lipoïdases qui existent dans les deux sortes de venins, mais elle peut dépendre aussi de certains constituants albuminoïdes de nature banale entrant dans la composition chimique de chacun de ces poisons.

# SYNERGIE D'ANTICORPS PAR « DÉVIATION HIÉRARCHIQUE »

par C. PICADO.

*(Travail du Laboratoire bactériologique  
de l'Hôpital San José, Costa Rica).*

## I. — Faits antérieurs.

### 1° FACILITÉ DE PRODUCTION D'ANTICORPS AU COURS DE CERTAINES INFECTIONS.

On sait que les tuberculeux peuvent donner des sérums qui agglutinent certaines bactéries dont l'infection, apparente tout au moins, n'a pas été constatée chez ces malades. C'est ainsi que Madgwick et Partner [1] ont montré que le sérum de 73 tuberculeux, pendant trois mois qu'ont duré les recherches, agglutinait le bacille d'Eberth à des taux élevés (34,2 p. 100 des sujets examinés), quoique ces malades n'aient jamais été vaccinés ou n'aient pas été infectés par le bacille typhique. Par contre, l'examen de 100 sérums de sujets atteints de maladies mentales, que les auteurs ont pris comme témoins, se trouvant dans de mêmes conditions que les tuberculeux, n'ont donné que des résultats négatifs ou des agglutinations faiblement positives à des taux assez bas.

Sarnowiec [2], expérimentant sur des cobayes, a trouvé que « le filtrat de bacille de Bang, dont le pouvoir agglutinogène chez les animaux neufs est très faible (jusqu'au 1/100<sup>e</sup>) exerce chez les animaux tuberculeux une action antigénique plus marquée (agglutination jusqu'au 1/300<sup>e</sup>).

« Par contre, l'injection préalable de BCG ou de bacilles tuberculeux morts, n'augmente pas sensiblement le taux de l'agglutination produite par l'injection de filtrat de bacille de Bang. »

Nasta et Weinberg [3] ont signalé pour les hémolysines un

taux sensiblement supérieur chez les lapins vaccinés par le BCG, que chez les témoins. Pour les agglutinines, on a noté aussi une différence, quoique moins prononcée, en faveur des vaccinés; quant aux sensibilisatrices et aux précipitines, leur production a été égale chez les vaccinés et les témoins.

Cruveilhier, Nicolau et Kopciowska [4 et 5] trouvent que les lapins qui reçoivent en même temps que le vaccin antityphique, une émulsion de cerveau rabique, donnent un taux d'agglutinines supérieur à celui donné par d'autres lapins qui reçoivent du cerveau normal, quoique ces derniers donnent un sérum qui est aussi plus riche en agglutinines que celui du lot de lapins témoins qui ne reçoivent que de l'eau physiologique. D'autres lapins, dont le taux d'agglutinines antityphiques est déjà tombé assez bas, inoculés sous la peau, vingt jours de suite, avec du cerveau rabique, montrent une augmentation très nette du pouvoir agglutinant. Les auteurs considèrent cette augmentation des agglutinines comme étant liée à la présence du virus vivant car l'on peut obtenir les mêmes résultats si l'on centrifuge l'émulsion de cerveau rabique et qu'on inocule le liquide surnageant privé de substance nerveuse.

« La vaccination antirabique administrée aux lapins avant, pendant ou après l'injection d'hématies de mouton, augmente d'une manière intense le taux des hémolysines dans le sérum. Cette augmentation est beaucoup moins marquée chez les animaux témoins auxquels on injecte des émulsions de névraxe normal. »

## 2° LA SYNERGIE DES ANTICORPS.

Weinberg et ses collaborateurs 6, 7, 8, 9 et 10, ont établi que les agglutinines antivibron septique, antihistolytique, anti-*sporogenes*, anti-*coli*, etc., sont renforcées spécifiquement par la présence de traces de sérum antitoxique de même nom que les microbes correspondants et que, d'autre part, la floculation des toxines par l'antisérum correspondant, est accentuée par l'addition d'une petite quantité de ces microbes. Il y a donc une synergie spécifique des agglutinines + floculines.

Les sérums peuvent, d'autre part, être renforcés dans leur pouvoir anti-infectieux, par mélange avec d'autres sérums

d'espèce différente : c'est ainsi que le sérum anti-*perfringens* + sérum antigangréneux polyvalent est augmenté dans son pouvoir anti-infectieux vis-à-vis du *pèrfringens*, dans une quantité qui dépasse de beaucoup celle qui est donnée par simple addition numérique. Le pouvoir anti-infectieux pour le vibron septique ou pour *œdematiens*, se trouve, par contre, à peine augmenté, ou sensiblement égal dans le mélange. La présence d'anticorps naturels anti-*perfringens*, dans le sérum normal des chevaux, expliquerait, d'après les auteurs, ces faits.

Pour la préparation des sérums antigangréneux, jouissant à la fois de bonnes propriétés antitoxiques et antimicrobiennes, il faut employer des antigènes mixtes comprenant toxine et éléments microbiens associés. Le mélange des sérums obtenus avec l'un ou l'autre des antigènes séparément donne un titre inférieur : antimicrobien et antitoxique.

D'autre part, si l'on immunise des lapins, soit avec l'une des espèces microbiennes seule, soit avec un mélange à parties égales de *coli* + *perfringens* + vibron septique, de manière que, dans le cas du mélange, les animaux ne reçoivent que 1/3 de chaque espèce microbienne, tandis que ceux immunisés avec chaque microbe, séparément, reçoivent trois fois cette dose, les animaux ayant reçu le mélange d'antigènes microbiens, donnent un sérum dont le taux d'agglutination pour chaque espèce microbienne n'est pas inférieur à celui obtenu par immunisation avec un seul microbe. Il y a donc synergie des anticorps et les auteurs se demandent si ce fait n'est pas une manifestation de la synergie *in vitro* déjà décrite par Weinberg et Barolle.

Rouslacroix et Boiron [11] en injectant des bacilles d'Eberth et des bacilles paratyphiques soit simultanément soit alternativement, ont constaté : 1° que l'un d'entre eux est toujours moins agglutiné que les autres : que pour les germes restants, la dose totale d'antigène microbien nécessaire pour obtenir un certain taux d'agglutination, est beaucoup moins élevé si le germe spécifique est associé avec d'autres microbes.

Il ne s'agit pas d'une addition conjuguée, *in vitro*, car ces mêmes sérums, après l'épreuve de saturation des agglutinines, montrent le même taux d'agglutination spécifique, il y a donc, d'après les auteurs, une synergie des antigènes. Pour d'autres



microbes : *B. coli*, bacille pyocyanique et *B. prodigiosus*, on a obtenu des résultats comparables.

### 3° LES VACCINATIONS ASSOCIÉES.

Ramon et ses collaborateurs [12 et 13], après une série de recherches devenues classiques sur le renforcement de la production d'antitoxines par mélange de substances inertes à l'antigène, lors de leur inoculation à l'animal, ont montré, dernièrement, que l'on peut associer un vaccin microbien à une anatoxine et que, dans ce cas, les corps microbiens contribuent à la production d'un taux plus élevé d'antitoxine, pourvu que l'injection des antigènes soit faite par mélange et au même endroit. Ils ont ainsi établi l'avantageuse et bienfaisante méthode des vaccinations associées. L'injection des antigènes faite en même temps, mais séparément et dans des points différents du corps ne conduit pas à cette exaltation des productions d'antitoxines.

## II. — Nouvelles recherches.

Il semble donc bien établi et suffisamment confirmé que lors d'une hyperimmunisation à l'aide de divers antigènes appropriés, il y a une « synergie » antigénique, à laquelle correspond une synergie des anticorps décelable *in vitro* comme *in vivo*.

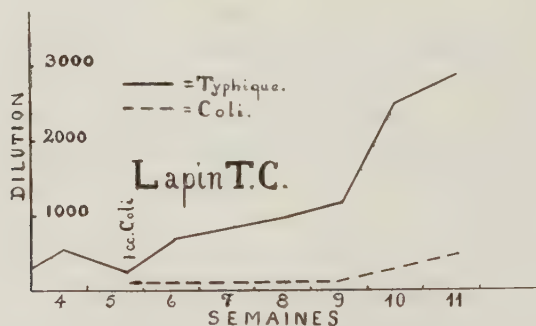
Les recherches que j'ai conduites visent à déterminer les changements de production d'anticorps, lors d'une faible immunisation chez des animaux suivis individuellement et lorsqu'ils sont immunisés, soit par un seul antigène, soit à l'aide d'un couple antigénique, puis éprouvés par l'injection d'un nouvel antigène plus ou moins apparenté aux antigènes primitifs. J'ai cherché aussi à étudier *in vitro* quelques mélanges de sérums avec ou sans incubation préalable.

### 1° ANIMAL IMMUNISÉ PAR UN SEUL ANTIGÈNE.

A. AGGLUTININES (1). — Un lapin reçoit par voie intraveineuse 3 cent. cubes d'une émulsion de bacilles typhiques tués par

(1) Pour tous les cas la lecture est faite après centrifugation.

chauffage pendant une heure à 59°-60°; une semaine plus tard, l'animal reçoit 4 cent. cubes du même vaccin. Quinze jours après cette seconde injection, son sérum, dilué à 1/500, agglutine le bacille typhique vivant; ce taux diminue dans la suite, et au bout d'un mois après la dernière injection, il n'est que de 1/250. A la même date, ce sérum agglutine une souche donnée de colibacilles à 1/250. C'est alors que nous injectons par voie intraveineuse, 1 cent. cube d'émulsion de même souche de colibacilles tués par chauffage; cette émulsion correspond à une concentration opacimétrique dix fois plus forte que celle du



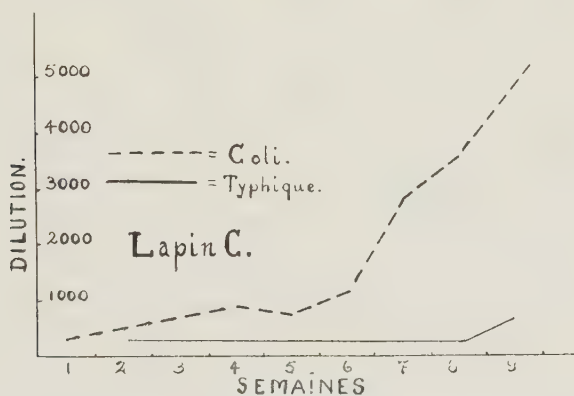
COURBE 1.

vaccin T. A. B. de l'Institut Pasteur. Un lapin témoin reçoit une même quantité du vaccin colitique.

Chaque semaine, on dose chez ces 2 lapins les agglutinines antityphiques et anti-*coli*, et l'on constate que le lapin T. C., ayant reçu l'injection unique de colibacilles, après une faible immunisation antityphique, se comporte comme si cette dernière injection avait été du vaccin typhique, car ce sont seulement les agglutinines antityphiques que l'on voit monter à des taux qui n'avaient jamais été atteints avant l'injection de colibacilles, tandis que les agglutinines anti-*coli*, restent à leur taux primitif; tout se passe comme si, dans les premières semaines qui suivent l'injection de *B. coli*, le lapin avait utilisé ces microbes, non pas pour élaborer des agglutinines spécifiques anti-*coli*, mais bien pour renforcer le taux des agglutinines antityphiques, préexistantes dans leur sérum. Il y a donc une « synergie », *in vivo*, « déviée » en faveur des

agglutinines antityphiques. Cette « synergie » n'est que temporaire, comme nous le verrons plus loin, mais chez le lapin G, qui nous sert comme témoin, l'on voit, par contre, les agglutinines anti-*coli*, augmenter régulièrement dans le sérum. Les courbes n° 1 et n° 2 montrent l'évolution des agglutinines chez ces deux lapins.

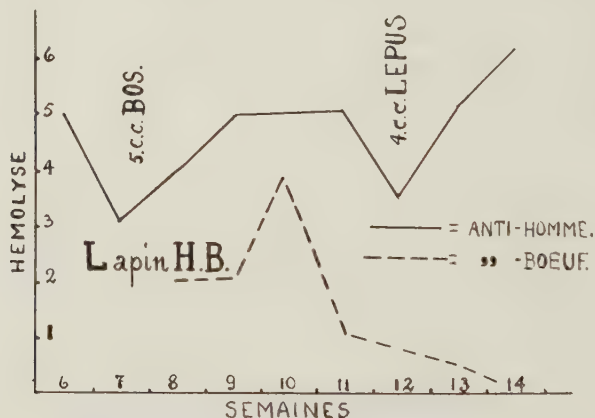
**B. HÉMOLYSINES.** — Le lapin faiblement immunisé par des injections répétées de globules humains lavés, est conservé



COURBE 2.

jusqu'au moment où les hémolysines commencent à diminuer. Si l'on injecte alors soit des globules de Mouton, soit des globules de Bœuf, nous voyons, au bout d'une semaine, que le taux d'hémolysines anti-Homme augmente régulièrement pendant quelque temps et, quoiqu'il y ait augmentation des hémolysines naturelles anti-Mouton, et faible production d'hémolysines anti-Bœuf (dans le cas d'injection de globules de cette dernière espèce), on voit que la suprématie correspond à l'augmentation d'hémolysines anti-Homme, qui dépassent, souvent, le taux primitivement atteint, lorsque l'animal ne recevait que des globules humains. Si l'injection intrapéritonéale, réactivante, est effectuée avec des globules lavés de la même espèce, c'est-à-dire des globules de lapin ; il y a toujours une certaine production d'hémolysine, les résultats sont les mêmes, plus nets encore. Il semblerait que l'animal,

incapable d'élaborer des hémolysines contre les globules de la même espèce, a utilisé, encore cette fois, les globules injectés de sa propre espèce pour augmenter la teneur de son sérum en hémolysines hétérologues, « déviées » électivement dans le sens anti-Homme, exclusivement, et sans qu'il y ait la moindre augmentation pour les hémolysines anti-Bœuf qui continuent à diminuer progressivement. La courbe n° 3 (H. B.).



COURBE 3.

nous montre l'évolution des hémolysines chez l'un de ces lapins.

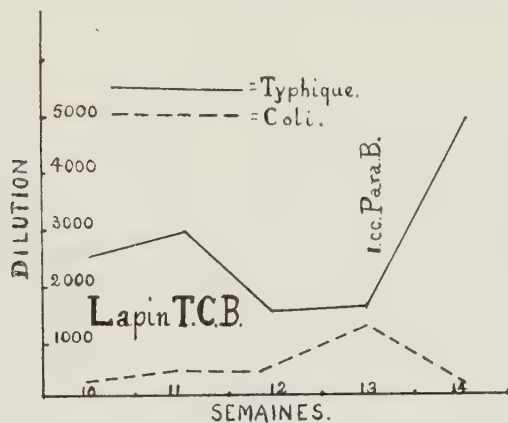
## 2° ANIMAL IMMUNISÉ SUCCESSIVEMENT PAR DEUX ANTIGÈNES.

A. AGGLUTININES. — Le lapin C. T. qui a reçu, après une faible vaccination antityphique, une injection de colibacilles (courbe n° 1) est gardé jusqu'au moment où la teneur en agglutinines antityphiques est sensiblement égale à la teneur en agglutinines anti-*coli*, ce qui arrive deux mois après l'injection de colibacilles. On injecte alors à ce lapin 1 cent. cube de paratyphiques B, chauffés à 60° pendant une heure et à une concentration opacimétrique égale à celle qui a été adoptée pour le colibacille : soit  $T. A. B. \times 10$ . On assiste alors à un brusque écartement de la courbe des agglutinines : une semaine après l'injection du para B, on dose les agglutinines, après saturation par para B, et l'on voit que l'aggluti-



nation des bacilles typhiques se produit à la dilution de 1/5.000, celle des colibacilles qui, avant l'injection avait déjà monté à 1/1.200, descend brusquement à 1/600, tandis que le para B n'est agglutiné que faiblement à la dilution de 1/500.

L'injection de para B, dans ce cas, produit un effet tout à fait comparable à celui de l'injection de globules de la même espèce au lapin qui a reçu successivement des globules d'Homme et de Bœuf. En effet, cette injection semble, non seulement avoir été utilisée pour renforcer les agglutinines



COURBE 4.

antityphiques, mais aussi pour que cette « déviation » entraîne les agglutinines anti-*coli* déjà existantes dans le sérum du lapin T. C. B. (courbe n° 4).

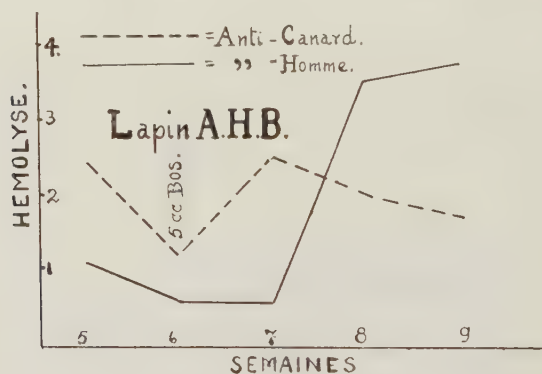
**B. HÉMOLYSINES.** — Les lapins immunisés par les globules d'Homme, puis par les globules de Mouton, reçoivent, quand les hémolysines commencent à baisser, une nouvelle injection intrapéritonéale de globules de Bœuf; l'on voit alors une augmentation, presque parallèle des hémolysines anti-Homme, ainsi que des hémolysines anti-Mouton.

### 3° ANIMAL IMMUNISÉ SIMULTANÉMENT PAR UN COUPLE ANTIGÉNIQUE.

Si l'on considère les cas que nous venons d'exposer précédemment, on voit que l'on peut admettre aussi bien que la

« déviation » soit conduite vers les anticorps qui sont contenus en plus grande quantité chez l'animal, tandis que d'autres peuvent interpréter cette « déviation » comme poussée vers les antigènes qui, chimiquement, sont les plus proches (courbes 3 et 4).

En ce qui concerne l'interprétation de la réactivation des hémolysines anti-Homme et anti-Mouton, lors de l'injection de globules de Bœuf, elle se complique beaucoup par le fait que les globules de Bœuf peuvent à la fois réactiver les hémolysines anti-Homme, contenues en plus grande quantité,



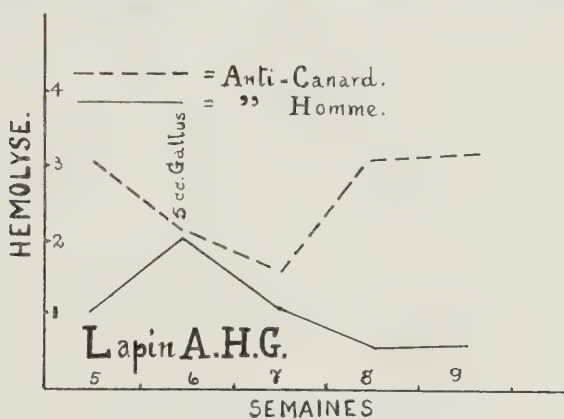
COURBE 3.

et aussi produire des hémolysines de groupe anti-Ruminants, capables d'augmenter, par addition, les hémolysines anti-Mouton. D'autre part, il ne faut pas oublier les probabilités de production d'anticorps type Forsmann.

Pour essayer d'élucider ces diverses interprétations, nous avons immunisé des lapins à l'aide des couples antigéniques et, lors de la chute des anticorps, nous avons injecté un nouvel antigène plus apparenté soit à l'un, soit à l'autre des antigènes primitifs.

**HÉMOLYSINES.** — Les lapins reçoivent un mélange à parties égales de globules lavés d'Homme et de Canard (1 cent. cube, 2 cent. cubes, 4 c. c. 5, 4 c. c. 5; les deux premières injections par voie intraveineuse, la troisième et la quatrième par voie intrapéritonéale). Les lapins qui vont servir comme témoins

reçoivent le même traitement, mais avec des globules de l'une ou de l'autre espèce. Trois semaines après la dernière injection, on constate que le taux des hémolysines commence à diminuer. L'on injecte alors par voie intraveineuse 5 cent. cubes de globules lavés de Bœuf à l'un des lapins anti-Homme + anti-Canard et 5 cent. cubes de globules de Coq à l'autre lapin immunisé de la même manière; le dosage des hémolysines montre qu'il y a une réactivation par « déviation » élective dans le sens de la parenté zoologique. Les globules



COURBE 6.

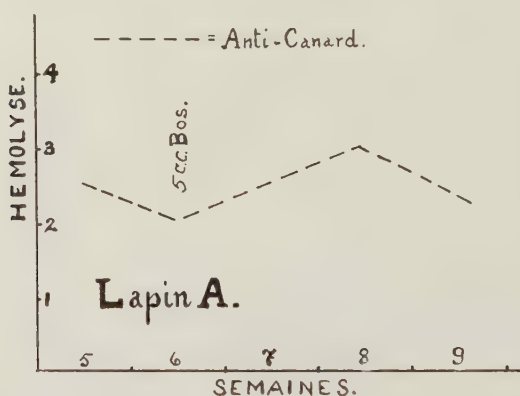
de Bœuf remontent les hémolysines anti-Homme nettement, et d'une manière très faible celles anti-Canard, tandis que l'injection de globules de Coq renforce les hémolysines anti-Canard, tout en restant indifférente vis-à-vis des hémolysines anti-Homme.

Dans le cas des lapins qui ont reçu uniquement les globules d'Homme ou les globules de Canard, l'injection réactivante de globules de Mammifères ou d'Oiseaux est utilisée indifféremment pour exalter le taux des hémolysines préexistantes sans présenter alors la « déviation » élective, d'ordre zoologique si nettement mise en évidence lors de l'immunisation par le couple globules Mammifère + Oiseau (courbes 5, 6, 7 et 8). Dans ces cas, la « déviation hiérarchique » des anticorps est conduite vers l'anticorps le plus apparenté. Il semblerait que lorsqu'il y a deux chemins à choisir, pour ainsi dire,

l'antigène nouvellement injecté, est homologué et incorporé à son anticorps le plus proche, mais, s'il n'y a pas possibilité de sélection, la réactivation s'achemine vers l'anticorps unique, quel qu'il soit.

#### 4° SYNERGIE BANALE *in vitro*.

A. AGGLUTININES. — Si l'on mélange en parties égales, le sérum du lapin *T. C.* (courbe n° 1) qui agglutine le bacille typhique à la dilution de 1 : 1.250 et le colibacille à 1 : 250 avec le sérum du lapin *C* (courbe n° 2) qui agglutine le



COURBE 7.

typhique à 1 : 200 et le colibacille à 1 : 1.250, on peut supposer que le mélange agglutinera le bacille typhique à 1 : 725 et le colibacille à 1 : 750; il n'en est rien. Les taux d'agglutination sont pour le typhique 1 : 1.250 et pour le colibacille 1 : 833. Il y a ici un phénomène synergique double, mais plus accentué pour les agglutinines typhiques.

Avec des mélanges de sérum du lapin *C.*, et de sérum d'autres lapins immunisés par d'autres races de bacilles d'Eberth, nous constatons toujours une synergie très marquée en faveur des agglutinines typhiques.

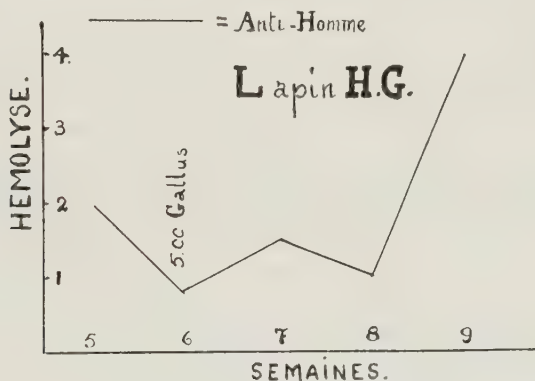
Si l'on mélange le sérum du lapin anti-coli avec du sérum de malades de fièvre typhoïde, on assiste au même renforcement des agglutinines antityphiques, même si l'on éprouve les mélanges après saturation par les colibacilles. Ce renforcement



ne se produit pas si l'on emploie du sérum de lapin normal.

Pour savoir si le contact des bacilles typhiques avec un sérum anti-coli les rend plus sensibles aux agglutinines spécifiques, nous avons fait l'expérience, avec des résultats négatifs. Il semble donc que le phénomène se produit entre sérum et sérum, sans que les bacilles agglutinables aient rien à voir dans cette incorporation ou homologation des agglutinines hétérologues.

B. HÉMOLYSINES. — Il est bien connu que les mélanges de sérums hémolytiques ne produit pas une hémolyse correspon-



COURBE 8.

dant à la moyenne mathématique, mais que celle-ci peut être diminuée aussi bien qu'augmentée ; néanmoins, nous avons évalué les hémolysines d'un mélange, à parties égales, de sérum de lapin anti-Canard et de lapin anti-Homme. Les saignées étaient répétées à sept jours d'intervalle, et les hémolysines étaient dosées dans le sérum frais, ainsi que dans celui inactivé, et en présence d'une même dose d'alexine. Nous avons pu constater qu'il y avait toujours augmentation des hémolysines dans les sérums mélangés, mais que la synergie ne se produisait pas toujours dans un sens déterminé, mais que d'une semaine à l'autre, le mélange des sérums des mêmes lapins présentait des fluctuations inattendues soit en faveur des hémolysines anti-Homme, soit en faveur des hémolysines anti-Canard.

5° SYNERGIE *in vitro* APRÈS INCUBATION PRÉALABLE.

A. ANTICOAGULINES. — On mélange, à parties égales, d'une part, sérum antiothropique, de l'Institut Butantan, avec du sérum antivipère de l'Institut Pasteur et, d'autre part, du sérum antiothropique avec du sérum antistreptococcique.

1 cent. cube de chaque mélange reçoit 0 c. c. 05 de venin de *Bothrops atrox* à 1 p. 1.000 ; on porte à l'étuve et après une heure on constate que 1 cent. cube de sang citraté est coagulé en dix minutes par IV gouttes, soit du mélange Bothrops + sérum antivipère, soit du mélange Bothrops + sérum antistreptococcique. Par contre, si l'on garde les sérums mélangés dans des tubes scellés, à l'étuve à 37° pendant une semaine, on constate que, toutes conditions égales, le mélange Bothrops + sérum antivipère coagule au bout de trente minutes, tandis que pour le sang citraté ayant reçu les IV gouttes du mélange incubé Bothrops + sérum antistreptococcique, c'est à peine si, au bout de plusieurs heures, il présente un léger flocon de fibrine dans le plasma qui surnage les globules sédimentés.

L'incubation de huit jours à 37° a donc augmenté le pouvoir anticoagulant du sérum antiothropique, soit par mélange avec le sérum antivipère, soit par mélange avec le sérum antistreptococcique ; mais, pour ce dernier mélange, et contre tout ce qu'il était légitime d'espérer, le renforcement dépasse de beaucoup celui obtenu par mélange avec son proche parent le sérum antivipère.

B. ANTIVENINS. — Si l'on mélange un sérum neutralisant au centimètre cube 0 milligr. 75 de venin bothropique pour pigeon, avec son volume, soit de sérum antivipère, soit de sérum antistreptococcique, on constate que les mélanges récemment préparés possèdent le même pouvoir neutralisant que le calcul fait prévoir, soit 0 milligr. 375 par centimètre cube du mélange. Mais si le mélange des sérums est laissé, dans des tubes scellés, pendant huit jours à l'étuve à 37°, on constate que, tandis que le mélange bothropique + antivipère garde le même titre antivenimeux, le mélange bothropique + antistreptococcique possède un pouvoir antivenimeux qui est monté à 0 milligr. 43

par centimètre cube, soit une augmentation de 12 p. 100 environ. Le séjour à 37°, prolongé pendant deux semaines, n'augmente pas la valeur antitoxique atteinte la première semaine. D'autre part, si l'on fait des mélanges composés par 25 p. 100 de sérum bothropique + 75 p. 100 d'autres sérums : antivipère, antistreptococcique, antidysentérique ou normal de cheval, on voit que dans ces mélanges au 1/4, le sérum antistreptococcique renforce aussi le pouvoir antivenimeux du sérum antibothropique, mais que l'avidité en est diminuée, la neutralisation demandant alors un séjour de deux heures à 37°, tandis que dans les mélanges au 1/2 celle-ci se produit en une heure.

C. ANTITOXINES. — On mélange, à parties égales, du sérum antidiphthérique de l'Institut Pasteur (n° 17035 dosant 300 unités

TABLEAU I. — **Propriétés antitoxiques du mélange : Sérum antidiphthérique + Sérum normal de cheval. Avec ou sans incubation préalable.**

COBAYES de 300 grammes	INJECTÉS AVEC :	MORT EN :	VALEUR ANTITOXINE en M.M.
3 cobayes	10 M.M. de toxine + 0 c.c. 9 du mélange des sérums à 1:2.000. Incubé 7 jours à 37°.	Survie sans escarre.	2 c.c. du mélange 44.444 M.M.
3 cobayes	10 M.M. de toxine + 0 c.c. 9 du mélange des sérums à 1:2 000 Mélange de sérums sans sans incubation préalable.	24 à 40 heures.	
3 cobayes	10 M.M. de toxine + 1 c.c. de sérum antidiphthérique seul à 1:4.000.	40 à 64 heures.	
3 cobayes	10 M.M. de toxine + 1 c.c. 1 de sérum antidiphthérique seul à 1:4.000.	Survie.	1 c.c. 36.363 M.M.

antitoxiques au centimètre cube avec du sérum normal de cheval (Lederle 60 H 2091); on répartit en tubes scellés qu'on laisse pendant une semaine à 37°. Au bout de ce temps, on prépare, avec les mêmes ampoules de sérum, un mélange tout frais et l'on procède à la vérification du pouvoir antitoxique

après incubation de deux heures à 37°, vis-à-vis de la toxine de l'Institut Pasteur, tuant le cobaye de 300 grammes avec 1/500 de centimètre cube (tableau page précédente).

Puisque le sérum normal de cheval employé neutralise moins de 2 unités antitoxiques par centimètre cube, le mélange à parties égales des deux sérums devrait neutraliser, tout au plus, 36.563 M. M. et non pas 44.444, comme le montre l'expérience. Il s'ensuit que, par mélange avec son volume de sérum normal de cheval, le taux antitoxique du sérum antidiphthérique, a été augmenté de plus de 20 p. 100.

#### 6° INJECTION D'IMMUNoSÉRUMS A L'ANIMAL NEUF.

A. SÉRUM HOMOLOGUE AGGLOUTINANT UN SEUL MICROBE. — Un lapin neuf reçoit par voie intraveineuse 5 cent. cubes de sérum frais d'un lapin immunisé contre le bacille typhique mort, et dont le taux d'agglutination est de 1 : 4.000. On saigne le lapin receveur quinze minutes, deux heures, dix-huit heures et quarante-deux heures après l'injection; le sérum est séparé après vingt-quatre heures de coagulation et chauffé, chaque fois, une demi-heure à 56°. Puis on dose les agglutinines de divers échantillons et l'on obtient :

Sérum de 15 minutes agglutiné à 1:400.

Sérum de 2 heures agglutiné à 1:200.

Sérum de 18 heures agglutiné à 1:200.

Sérum de 42 heures agglutiné à 1:1.200.

C'est-à-dire qu'après une exaltation passagère, les agglutinines se comportent comme si elles étaient tout simplement diluées dans le sang du lapin receveur; après une incubation de quarante-deux heures, celles-ci se sont renforcées, aux dépens de l'animal receveur, pour monter à un taux égal à six fois sa teneur primitive.

Dans cette expérience, le lapin donneur avait reçu la dernière injection de bacilles morts, une semaine avant d'être saigné pour injecter le lapin neuf, et quoique la période écoulée entre l'inoculation et la dernière saignée ne fut que de quarante-deux heures, l'on pourrait objecter que le sérum du donneur



transfusait non seulement des agglutinines tout élaborées, mais encore de l'antigène en voie de transformation et que celle-ci se continuait tout simplement dans le sang du lapin receveur. Pour répondre à ces objections probables, nous avons procédé, dans les autres expériences, de façon à n'employer comme donneur que des animaux ayant reçu la dernière injection de vaccin trois semaines avant la saignée.

#### B. SÉRUM HOMOLOGUE AGGLUTINANT DEUX MICROBES ÉLOIGNÉS.

— Les lapins donneurs ont reçu à plusieurs reprises un vaccin composé par des colibacilles et par des streptocoques morts, en parties égales, la dernière injection étant faite avec une vieille culture chauffée à 60°, complète sur bouillon, âgée de deux semaines; leur sérum, prélevé trois semaines après la dernière injection, agglutine tant le colibacille que le streptocoque à 1 : 6.000. Un lapin neuf dont le sérum n'agglutine, au taux de 1 : 200, ni l'un ni l'autre de ces microbes, reçoit 10 cent. cubes d'immunsérum par voie intraveineuse. Ce lapin est saigné successivement au bout d'une heure, vingt-quatre heures et quatre jours. Chaque fois, le sérum, mis en ampoules, est inactivé une demi-heure à 56°. Le dosage des agglutinines, dans des divers échantillons, a donné :

	POUR COLIBACILLE	POUR STREPTOCOQUE
Sérum de 1 heure . . . . .	1:625	1:625
Sérum de 24 heures . . . . .	1:1.500	1:1.500
Sérum de 4 jours . . . . .	1:625	1:625

Dans ce cas, de même que lorsqu'on a injecté du sérum antityphique, les agglutinines se sont trouvées renforcées, au même taux et en même temps, tant pour le colibacille que pour le streptocoque.

C. SÉRUM HÉTÉROLOGUE AGGLUTINANT DEUX MICROBES. — 5 cent. cubes du sérum employé dans l'expérience précédente ont servi pour inoculer une Poule dont le sérum n'agglutinait, non plus, ni le colibacille ni le streptocoque à 1 : 200; le taux des agglutinines dans les diverses saignées a été :

	POUR COLIBACILLE	POUR STREPTOCOQUE
Sérum de 1 heure . . . . .	1:1.250	1:1 250
Sérum de 24 heures . . . . .	1:625	1:2.500
Sérum de 4 jours . . . . .	1:2.500	1:1.250

Cette expérience montre que le temps optimum de renforcement des agglutinines transfusées n'est pas forcément le même pour chacune d'elles, et si nous comparons ces résultats avec ceux obtenus chez le lapin par inoculation du même sérum agglutinant, nous verrons que les diverses espèces animales ne réagissent pas de la même manière à la suite de l'injection d'un sérum agglutinant, polyvalent : pour certaines espèces le renforcement peut être dissocié, tandis que pour d'autres il ne l'est pas.

**D. SÉRUM HÉTÉROLOGUE PRÉCIPITANT.** — Le sérum du lapin, ainsi que celui de la poule de l'expérience que nous venons de décrire, est riche, non seulement en agglutinines mais aussi en précipitines pour un antivirus mixte : strepto-colibacillaire fait avec une culture d'un mois dans de l'eau peptonée, puis filtrée à trois reprises sur bougies L3, L5 et L7. Or, les mélanges de 1 cent. cube d'antivirus + 0 c.c. 1 de sérum de poule ou de lapin, dilué, soit à 1 : 100, soit à 1 : 1.000 donnent un précipité qui est plus précoce et plus marqué avec le sérum de vingt-quatre heures pour le lapin et avec celui de quatre jours pour la poule. Si l'on tient compte de la dilution du sérum injecté, dans le sang de l'animal receveur, on voit que les précipitines, seraient au taux de 1 : 100.000 dans le sérum de l'animal receveur, chiffre qui est au moins dix fois au delà du calcul mathématique, le donneur ne précipite qu'à 1 : 10.000 au bout de vingt-quatre heures; il s'ensuit qu'il y a eu un renforcement des précipitines ainsi que des agglutinines, après une période d'incubation variable d'une espèce à l'autre.

**E. SÉRUM HOMOLOGUE HÉMOLYTIQUE.** — Un lapin reçoit par voie intraveineuse 5 cent. cubes de sérum hémolytique anti-Mouton. Les hémolysines circulantes, à partir d'une heure, commencent à baisser; il n'y a donc aucun renforcement comparable à celui obtenu pour les agglutinines et précipitines.

F. SÉRUM HÉTÉROLOGUE ANTIVENIMEUX. — Un lapin reçoit par voie intraveineuse 10 cent. cubes de sérum antiothrophique; on fait des prises de sang quinze minutes, deux jours et cinq jours après l'injection; 1 cent. cube de sérum de chaque saignée neutralise 0 milligr. 10 de venin de *Bothrops atrox*, « in vitro » par incubation de deux heures à 37°. Des doses inférieures à 1 cent. cubes de sérum, ne sauvent pas les pigeons injectés; comme, d'autre part, 0 c.c. 1 de sérum antiothrophique + 0 c.c. 9 de sérum normal de lapin, neutralisent aussi la même dose de venin, il s'ensuit que le sérum antivenimeux injecté au lapin n'a été nullement renforcé.

Les travaux de Ramon et Falchetti [14] montrent que pour l'antitoxine tétanique injectée au lapin il y a plutôt une perte. C'est ainsi que le lapin injecté avec 400 U. I. donne un sérum dont le pouvoir antitoxique maximum est atteint au bout de deux jours et dont la teneur en antitoxine dépasse à peine 1. U. I. au centimètre cube; mais ces savants ont utilisé la voie sous-cutanée.

#### 7° INDUCTION OU INCORPORATION ?

La substitution de certains composés faisant partie d'un antigène, par des composés semblables d'origine hétérologue, pour reconstituer le complexe antigénique tel, par exemple, l'antigène pneumococcique obtenu avec du sérum de cheval + polysaccharides des pneumocoques (non antigéniques par eux-mêmes), tels aussi les antigènes constitués par des lipoides spécifiques unis à des albuminoïdes interchangeables, nous faisait concevoir l'augmentation des anticorps, que nous venons de décrire, comme une incorporation chimique d'éléments semblables tirés d'autres anticorps mis en présence : sorte de polymérisation ou gonflement moléculaire des noyaux constituant les anticorps spécifiques essentiels ce qui ferait, pourtant, varier le seuil de saturation par l'antigène correspondant; mais, pour éliminer la possibilité lointaine d'une induction par rayonnement, nous avons rempli des ampoules de quartz avec des immun-sérums, et les avons immergées dans des tubes renfermant les sérums normaux. Après des séjours variables à

l'étuve à 37°, nous avons cherché à déceler, dans les sérums normaux environnants, la présence d'hémolysines ou d'agglutinines induites ; les résultats ont été négatifs.

Pour tirer des conclusions définitives il faudrait, par des expériences très nombreuses, déterminer les variations individuelles. Nos expériences, forcément restreintes, ne nous autorisent à formuler que des conclusions préliminaires, sans rien prétendre de plus ; c'est à ce titre que nous les considérons.

### Conclusions.

1° Les *agglutinines* ainsi que les hémolysines du lapin faiblement immunisé par un seul antigène peuvent être renforcées par l'injection unique d'un antigène hétérologue, qui dans ce cas, ne produit pas d'anticorps spécifiques ; ceux-ci étant « déviés » temporairement vers les anticorps préexistants.

2° Les agglutinines ainsi que les hémolysines du lapin immunisé par deux antigènes de même ordre sont renforcées par « déviation hiérarchique » lors de l'injection unique du nouvel antigène.

3° Cette « déviation hiérarchique » est conduite, soit vers les anticorps à taux plus élevé, soit vers l'anticorps le plus apparenté, quand il s'agit d'un couple équivalent.

4° Le renforcement d'anticorps peut être obtenu par « déviation » d'anticorps inapparents, lors de l'injection de sang de la même espèce.

5° Les agglutinines et précipitines transfusées peuvent « dévier » d'autres anticorps circulants, connus ou inapparents, pour renforcer leur pouvoir.

6° Le mélange *in vitro* de certains immunsérums peut conduire, après une incubation variable, à une « déviation » qui renforce le pouvoir antitoxique de l'un des sérums du mélange.

7° Le renforcement *in vitro* de certains anticorps peut être aussi obtenu par mélange avec du sérum normal, apparemment dépourvu d'anticorps.



## BIBLIOGRAPHIE

- [1] MADGWICK et PARTNER. *The Lancet*, **222**, 1932, p. 1091.
- [2] SARNOWIEC. *C. R. de la Soc. de Biol.*, **118**, 1935, p. 1162.
- [3] NASTA et WEINBERG. *C. R. de la Soc. de Biol.*, **106**, 1931, p. 992.
- [4] CRUVEILHIER, NICOLAU et KOPCIEWSKA. *C. R. de la Soc. de Biol.*, **107**, 1931, p. 212.
- [5] CRUVEILHIER, NICOLAU et KOPCIEWSKA. *C. R. de la Soc. de Biol.*, **110**, 1932, p. 533.
- [6] WEINBERG et collaborateurs. *C. R. de la Soc. de Biol.*, **97**, 1927, p. 1326.
- [7] WEINBERG et collaborateurs. *Ces Annales*, **42**, 1928, p. 619.
- [8] WEINBERG et collaborateurs. *C. R. de la Soc. de Biol.*, **98**, 1928, p. 562.
- [9] WEINBERG et collaborateurs. *C. R. de la Soc. de Biol.*, **100**, 1929, p. 94.
- [10] WEINBERG et collaborateurs. *C. R. de la Soc. de Biol.*, **99**, 1928, p. 1824.
- [11] ROUSLACROIX et BOIRON. *C. R. de la Soc. de Biol.*, **108**, 1931, p. 675.
- [12] G. RAMON et collaborateurs. *C. R. de l'Acad. des Sc.*, **198**, 1933, p. 1361.
- [13] G. RAMON et collaborateurs. *Ces Annales*, **41**, 1933, p. 407.
- [14] G. RAMON et FALCHETTI. *C. R. de la Soc. de Biol.*, **119**, 1935, p. 6.

## ANTICORPS SPÉCIFIQUES DE LA MALADIE DE WEIL DANS L'URINE

par M. J. VAN DER HOEDEN.

*(Laboratoire de Bactériologie de la Clinique médicale  
de l'Université d'Utrecht.)*

Le séro-diagnostic de la maladie de Weil peut se faire en utilisant le sérum sanguin ou le liquide céphalo-rachidien. Dans ce dernier cas, la quantité d'anticorps spécifiques qu'on pourra déceler, sera ordinairement très minime. Le sérum ou le liquide céphalo-rachidien, mis en contact avec une culture vivante de leptospires fait apparaître une agglutination et une lyse des leptospires. La lyse sera cependant absente, si on utilise une culture de leptospires tuée auparavant par la formaline; par contre l'agglutination persiste.

Les agglutinines et lysines persistent souvent pendant longtemps (plusieurs années) dans le sérum sanguin après la guérison des malades.

J'ai pu démontrer la présence d'agglutinines et de lysines non seulement dans le sérum sanguin et le liquide céphalo-rachidien, mais aussi dans l'urine de malades atteints de la maladie de Weil. Après guérison complète, on peut encore déceler des anticorps spécifiques dans l'urine.

### I. — Recherches chez l'homme, chez le chien et chez le rat sauvage (1).

TECHNIQUE. — Nous employons de préférence de l'urine stérile. A l'urine non stérile, nous ajoutons du formol de façon à obtenir une concentration finale de 0,5 p. 100. Le phénomène de lyse apparaît assez fréquemment lorsque

(1) Voir J. VAN DER HOEDEN. *Ned. Fydschr. Geneesk.*, 79, 1935, pp. 1943-1953.

l'urine, à laquelle on a ajouté du formol, est mise en contact avec une culture de leptospires vivants. Dans ce cas, la lyse n'apparaît que lorsque la dilution de l'urine atteint une valeur supérieure à  $1/16$ . Nous avons souvent utilisé des urines non stériles. Dans ces cas, l'agglutination peut être exécutée parfaitement en se servant de cultures de leptospires formolées.

Nous avons utilisé différentes dilutions d'urine : d'abord de l'urine non diluée, ensuite des dilutions à  $1/2$ , à  $1/4$ , à  $1/8$ , etc. Voici comment nous procédons : à III gouttes de chacune de ces dilutions nous ajoutons III gouttes d'une suspension de culture de leptospires. On obtient de cette façon une dilution à  $1/2$ ,  $1/4$ ,  $1/8$ , etc. Les tubes sont mis à l'étuve à  $30^{\circ}$  durant deux heures. L'observation se fait à l'ultra-microscope après trois à cinq heures et elle est considérée comme définitive après vingt-quatre heures.

Nous avons toujours utilisé deux cultures différentes de leptospires : une culture de *L. ictéro-hémorragique* et une autre culture de leptospire, découverte en Hollande, en 1933, par Klarenbeek et Schüffner chez le chien : *L. canicola*. D'après ces auteurs, cette dernière variété serait la cause de nombreuses infections chez le chien. De temps en temps, le type *canicola* pourrait causer de pareilles infections chez l'homme (1).

### RÉSULTATS.

#### RECHERCHES DES ANTICORPS DANS L'URINE DE L'HOMME.

a) *Présence d'anticorps spécifiques dans l'urine chez les sujets atteints de la maladie de Weil, pendant la convalescence et après la guérison complète.*

Nous avons fait des recherches sur 72 personnes. Chez 26 sur 27 malades et convalescents, nous avons trouvé des anticorps spécifiques dans l'urine. Le seul cas négatif que nous ayons rencontré s'est présenté chez un sujet presque rétabli; les réactions obtenues avec l'urine de ce malade, ont été effectuées seulement sept et huit semaines après le début de la maladie, et elles étaient douteuses tandis que le sérum sanguin n'agglutinait que jusqu'à la dilution au  $1/300$ .

(1) DHONT, KLARENBECK, SCHUFFNER et VOET. *Ned. Tydschr. Geneesk.*, **78**, 1934, p. 5197.

Sur un total de 45 personnes *guéries*, 40 donnaient une réaction positive avec l'urine. Les résultats négatifs ont été trouvés :

1° Chez une personne, un an et cinq mois et demi après le début de la maladie; l'agglutination du sérum sanguin était faiblement positive, 1/300;

2° Chez une personne, deux ans après le début de la maladie.

3° Chez une personne, deux ans et cent trente-trois jours après le début de la maladie;

4° Chez une personne, trois ans et cent trente-neuf jours après le début de la maladie;

5° Chez une personne, sept ans et demi après la maladie (l'agglutination avec le sérum était négative).

Par contre, nous avons obtenu des résultats *positifs* chez une personne trois ans et cent quatre-vingt-dix-sept jours après le début de la maladie. Deux autres donnaient encore un résultat positif, l'un deux ans et treize jours et l'autre deux ans et cent soixante-dix jours après la guérison.

Ces résultats montrent que l'urine des personnes atteintes de la maladie de Weil, contient des agglutinines (et souvent aussi des lysines) et qu'on les trouve également dans l'urine des sujets guéris. Ce dernier fait s'accorde donc parfaitement avec les résultats trouvés avec le sérum sanguin. (Toutefois nous avons remarqué une exception à cette règle, chez une personne infectée par le leptospire canicole. L'urine fut examinée deux fois par semaine depuis le début de la maladie. La réaction dans l'urine était positive pendant trois mois et demi. Après ce temps, la réaction fut négative, tandis que le sang donnait encore une agglutination de 1/1.000).

Les anticorps spécifiques n'apparaissent dans l'urine qu'au bout de quelques jours, après l'apparition des anticorps dans le sang. Nous en donnons deux exemples :

Premier exemple : chez un malade nous avons trouvé des agglutinines dans le sang (1/160) six jours après le début de la maladie; l'urine au sixième et au septième jour ne donnait, au contraire, encore aucune réaction positive. A partir du huitième jour, l'urine était devenue agglutinante (1/16).

Deuxième exemple : L'agglutination était positive avec le sang, neuf jours après le début de la maladie (1/640) tandis que les urines ne contenaient encore aucune trace d'agglutina-



tion; c'est seulement à partir du onzième jour que les agglutinines apparaissent dans les urines (1/8).

Nous avons trouvé chez deux malades des agglutinines dans le sérum sanguin, dans l'urine et dans le liquide céphalo-rachidien. Après quelque temps, le pouvoir agglutinant du liquide céphalo-rachidien a disparu, tandis qu'il a persisté dans les urines. Comme exemple, nous donnons le cas suivant qui est assez typique.

Le liquide céphalo-rachidien d'un sujet, devenu malade à la fin du mois d'août donnait les réactions d'agglutination suivantes : le 12 septembre jusqu'au titre 40, le 26 septembre jusqu'au titre 32, le 2 novembre et le 13 novembre la réaction était négative (dilution à 1/2, etc.). L'agglutination de l'urine était toujours positive au moins jusqu'au 5 janvier 1935 (examen fait toutes les semaines) avec des titres compris entre 4 et 32 (le 5 janvier, 1/8).

Les titres dans l'urine des malades et des sujets guéris variaient entre 2 et 256.

TITRE	TITRES D'AGGLUTINATION dans l'urine		TOTAL
	des malades ou des convalescents	des personnes guéries	
Jusqu'à 1/2. . . . .	—	3	3
Jusqu'à 1/4. . . . .	1	5	6
Jusqu'à 1/8. . . . .	2	16	18
Jusqu'à 1/16. . . . .	8	7	15
Jusqu'à 1/32. . . . .	8	4	12
Jusqu'à 1/64. . . . .	3	1	4
Jusqu'à 1/96. . . . .	1	3	4
Jusqu'à 1/128. . . . .	1	1	2
Jusqu'à 1/256. . . . .	2	—	2
Total . . . . .	26	40	66

Les réactions des urines donnaient les résultats suivants :

	POSITIVE	NÉGATIVE
Examen moins d'un an après le début de la maladie. . . . .	58	1
Examen un à deux ans après le début de la maladie . . . . .	5	1
Examen deux à trois ans après le début de la maladie . . . . .	2	2
Examen plus de trois ans après le début de la maladie . . . . .	1	2
Total. . . . .	66	6

Le pouvoir agglutinant des urines existait presque toujours pour le *L. ictéro-hémorragique*, excepté chez 3 personnes dont les urines n'agglutinaient que le *L. canicola*. En effet, ces malades étaient infectés par une culture de ce type.

Il arrivait assez souvent que le sérum sanguin contenait en même temps des agglutinines pour les deux types de leptospires. Cette constatation était moins fréquente pour l'urine. Voici deux exemples : le sérum sanguin d'un malade agglutinait, après deux mois environ les deux types de leptospires jusqu'au même titre (1/1.250). L'urine, au contraire, n'agglutinait que le type qui était la cause de l'infection (titre 16 pour le *L. ictéro-hémorragique*).

Le sérum d'un autre malade agglutinait en même temps le type ictéro-hémorragique (dilution 1/960) et *canicola* (jusqu'à 1/320), mais l'urine n'agglutinait que le type ictéro-hémorragique jusqu'à 1/96.

Nous avons souvent observé qu'il n'existait aucun parallélisme entre les titres de l'agglutination des urines et du sang.

Voici un tableau d'agglutination qui nous semble très intéressant et qui fut observé chez un malade, âgé de dix-huit ans; début de la maladie le 20 décembre 1934.

TEMPS après le début de la maladie en jours	AGGLUTINATION de l'urine		AGGLUTINATION du sang	
	<i>L. ictéro- hémorragique</i>	<i>L. canicola</i>	<i>L. ictéro- hémorragique</i>	<i>L. canicola</i>
6. . . . .	0	0	80	160
7. . . . .	0	0	»	»
8. . . . .	4 faible.	8	800	3.200
9. . . . .	4 faible.	8	»	»
11. . . . .	0	8	»	»
12. . . . .	0	0	»	»
14. . . . .	8	4	»	»
16. . . . .	0	0	»	»
18. . . . .	4	2	800	3.200
19. . . . .	4	0	»	»
20. . . . .	4	0	»	»
21. . . . .	16	0	»	»
22. . . . .	8	0	»	»
23. . . . .	4	0	»	»
25. . . . .	8	0	»	»
26. . . . .	16	0	1.600	3.200
36. . . . .	32	0	9.600	3.200

Comme le démontre le tableau ci-dessus, le pouvoir agglutinant du sérum est, après six, huit, dix-huit et vingt-six jours, plus fort pour le type *canicola* que pour le type ictéro-hémorragique; c'est seulement après trente-six jours qu'il agglutine plus fortement le L. ictéro-hémorragique. L'urine agglutine le type *canicola* huit, neuf et onze jours après le début de la maladie; quatorze jours après le début, nous obtenons encore une légère agglutination, mais, à partir du dix-neuvième jour, l'agglutination fait défaut pour le type *canicola*, et, depuis ce moment, l'agglutination ne se fait plus qu'avec le type ictéro-hémorragique.

Les recherches de Schüffner et Ruys (1) ont fait ressortir que l'identification du type de leptospire est possible par la méthode d'absorption. Nous tenant à cette méthode, nous avons trouvé que notre malade était infecté par le type ictéro-hémorragique.

(L'homme qui exerce la profession de charcutier devint souffrant quelque temps après qu'un de ses deux chiens fut atteint d'une maladie. Ses deux chiens servaient à faire la chasse aux rats qui vivaient et rôdaient autour de la charcuterie. Le sérum du chien malade agglutinait le type L. ictéro-hémorragique à 1/320, le *L. canicola* à 1/40; l'urine agglutinait les deux cultures jusqu'à 1/32 et 1/2.)

L'examen de l'urine du malade nous a donc révélé plus vite un résultat *spécifique* que l'examen du sérum.

D'après les données cliniques, il ne pouvait exister aucune relation entre l'agglutination de l'urine et une lésion rénale quelconque. La réaction d'agglutination se montrait indépendante d'une albuminurie.

Enfin nous donnons, sous forme de tableau, les résultats d'agglutination (urines et sang) obtenus chez un malade que nous avons pu suivre minutieusement.

M..., homme âgé de vingt-huit ans, devenu malade le 15 décembre 1934. Il quitte la clinique le 8 février 1935.

6) EXPÉRIENCES DE CONTRÔLE. — Nous avons fait quelques expériences de contrôle chez l'homme. Dans ce but, nous avons examiné, d'après la même technique, les urines de 194 malades

(1) RUYS et SCHÜFFNER. *Ned. Tydsch. Geneesk.*, 78, 1934, p. 3410.

chez lesquels il n'existait aucun symptôme clinique qui aurait pu faire soupçonner la maladie de Weil.

TEMPS s'écoulant après le début de la maladie en jours	AGGLUTINATION de l'urine		AGGLUTINATION du sang	
	L. ictéro- hémorragique	L. canicola	L. ictéro- hémorragique	L. canicola
18 . . . . .	2	0	1.000	50
20 . . . . .	2	0	"	"
23 . . . . .	16	0	"	"
24 . . . . .	8	0	"	"
25 . . . . .	16	0	"	"
26 . . . . .	32	0	"	"
27 . . . . .	32	0	"	"
28 . . . . .	96	0	"	"
30 . . . . .	32	"	"	"
31 . . . . .	96	0	"	"
32 . . . . .	128	"	8.000	1.000
33 . . . . .	256	0	"	"
34 . . . . .	128	0	"	"
35 . . . . .	128	0	"	"
37 . . . . .	128	0	"	"
41 . . . . .	160	0	50.000	500
47 . . . . .	96	0	"	"
48 . . . . .	32	0	"	"
51 . . . . .	16	0	"	"
53 . . . . .	32	0	"	"
54 . . . . .	32	0	25.000	400
55 . . . . .	16	0	"	"

Sur 194 échantillons d'urine, 191 nous ont donné un résultat négatif. Un certain nombre (37) de ces malades présentaient une albuminurie, 15 autres un ictère. Deux échantillons d'urine non diluée ont donné une légère agglutination (titre 2). Le sérum d'une de ces deux personnes ne contenait aucune trace d'agglutinine. L'urine d'un troisième malade agglutinait nettement le leptospire ictéro-hémorragique jusqu'au titre 2 (le titre  $1/4$  étant négatif). A différentes reprises, nous avons réexaminé l'urine de ce malade et chaque fois nous avons obtenu la même agglutination. Le sérum au contraire n'agglutinait pas (dilution à  $1/10$ , etc.).

#### RECHERCHE DES ANTICORPS DANS L'URINE DU CHIEN.

Les mêmes recherches furent effectuées sur des chiens. Il a été démontré par Klarenbeek, Schüffner et leurs collaborateurs que les spirochétoses se rencontrent fréquemment chez le chien



en Hollande. Tous les cas aigus avec ictère ont pour cause *L. ictéro-hémorragique*. Chez des chiens atteints d'urémie par azotémie, on trouvait dans environ 90 p. 100 des cas comme agent causal le *L. canicola*.

Les recherches de Korthof, chez 131 chiens non sélectionnés, démontrent la grande fréquence de la spirochétose chez le chien (1).

Le rapport du nombre de chiens de rues agglutinant au-dessus du titre 1/100 au nombre de chiens ne donnant aucune agglutination est de 1/6 pour les animaux âgés de moins d'un an, de 2/7 entre un et deux ans, de 9/20 entre deux et huit ans, de 17/9 au-dessus de huit ans.

Parmi les 12 chiens examinés par nous et atteints de la maladie de Weil ou bien atteints d'une urémie par azotémie, 11 présentaient des agglutinines et souvent des lysines dans les urines. Comme chez l'homme, nous avons vu en premier lieu les agglutinines dans le sang, c'est-à-dire avant l'apparition dans les urines.

En outre, nous avons examiné 9 chiens *suspects* cliniquement de spirochétose; les urines de ces 9 animaux donnaient également une réaction positive.

Les urines de plusieurs chiens présentaient de plus fortes réactions d'agglutination que celles qu'on peut retrouver chez l'homme. (Les titres examinés étaient : 1 fois 1/2, 3 fois 1/8, 3 fois 1/16, 1 fois 1/32, 2 fois 1/64, 6 fois 1/96, 1 fois 1/160, 2 fois 1/960, 1 fois 1/2.000).

La détermination du premier jour de la maladie chez le chien peut entraîner certaines difficultés. En tenant compte de ce fait, nous avons trouvé chez un chien des agglutinines dans les urines à partir du cinquième jour de la maladie, chez un autre à partir du neuvième jour (après quatre jours négatif), chez un troisième à partir du douzième jour et chez un quatrième à partir du quinzième jour (après cinq et onze jours négatifs).

En troisième lieu, nous avons fait des recherches sur les urines de 59 chiens chez lesquels il n'existait aucun symptôme qui pût faire songer à une infection par des leptospires. Fait intéressant, 24 de ces animaux présentaient des agglutinines dans

(1) KORTHOF. *Ned. Fydschr. Geneesk.*, 74, 1930, p. 4097.

les urines pour le type ictéro-hémorragique ou le *canicola*.

Nous avons fait un examen du sang chez 7 chiens cliniquement non suspects et qui présentaient une réaction positive avec les urines. Dans tous ces cas, nous avons trouvé des agglutinines du type correspondant. Ces résultats s'accordent parfaitement avec ceux obtenus par Korthof cités plus haut. Ce phénomène, d'ailleurs, s'explique par le fait qu'il existe en Hollande un grand nombre de chiens infectés par des leptospires. En effet, chez 14 chiens isolés pendant longtemps dans les cages de laboratoire, nous n'avons jamais décelé d'agglutinines dans l'urine. En plus, nous avons trouvé que le nombre des chiens qui présentent des agglutinines dans les urines augmente avec l'âge (le rapport entre les réactions positives et négatives est de 15 sur 34 chez les chiens de moins de cinq ans et de 9 sur un au-dessus de cinq ans).

Sur 44 chiens qui présentaient une réaction positive, 28 nous ont donné une agglutination exclusivement pour le type ictéro-hémorragique ou bien une réaction plus intense que pour le type *canicola*.

#### RECHERCHE DES ANTICORPS DANS L'URINE DE RATS SAUVAGES.

Il était intéressant de rechercher si les urines de rats sauvages (réservoir du *L. ictéro-hémorragique*) contenaient des agglutinines. En effet, sur les 12 rats examinés au point de vue de l'agglutination, 6 présentaient des agglutinines dans le sérum sanguin et 4 de ceux-ci en même temps dans les urines. Fait remarquable, la culture du rein d'un rat décela la présence de leptospires (professeur Schüffner), tandis que ni l'urine, ni le sérum sanguin ne contenaient trace d'agglutinine. Une agglutination pour le type *canicola* n'a jamais pu être décelée chez le rat.

#### II. — Présence de substances sensibilisatrices dans l'urine des malades atteints de la maladie de Weil.

Il résulte des données précédentes que l'urine contient des agglutinines et des lysines dans les cas de spirochétose chez l'homme, le chien et les rats sauvages.

Quelques auteurs ont signalé l'existence de sensibilisatrices spécifiques dans le sérum des malades atteints de la maladie de Weil. Il nous a semblé intéressant de rechercher si ces anticorps sont décelables aussi dans l'urine. Pour faire ces réactions, nous nous sommes servi de l'antigène préparé d'après la méthode de Gaetgens (*Z. f. Imm. f.*, 79, 1933, p. 428). La réaction fut faite pour trois concentrations de l'urine : non diluée, deux fois diluée et trois fois diluée (titres : 1, 2 et 3).

RÉSULTATS	AGGLUTINATION	RÉACTION de déviation
12 échantillons d'urine contrôle. . . . .	Titre 0	Titre 0
1 échantillon d'urine contrôle. . . . .	Titre 0	Titre 2 (1)
1 urine d'un malade (maladie de Weil).	Titre 4	Titre 0
3 urines de malades (maladie de Weil).	Titre 8	Titre 0
2 urines de malades (maladie de Weil).	Titre 16	Titre 0
1 urine de malade (maladie de Weil) .	Titre 16	Titre 2
1 urine de malade (maladie de Weil) .	Titre 32	Titre 0
3 urines de malades (maladie de Weil).	Titre 32	Titre 1
2 urines de malades (maladie de Weil).	Titre 32	Titre 3
5 urines de malades (maladie de Weil).	Titre 96	Titre 0
1 urine de malade (maladie de Weil) .	Titre 96	Titre 2
1 urine de malade (maladie de Weil) .	Titre 192	Titre 2

Sauf la réaction de déviation du complément douteuse, obtenue avec un échantillon d'urine devant servir de contrôle, le tableau ci-dessus donne nettement l'impression qu'il existe des ambocepteurs spécifiques dans les urines de plusieurs individus atteints de la maladie de Weil. On ne trouve pas ces ambocepteurs d'une manière constante dans les urines, comme c'est le cas pour les agglutinines (8 réactions de déviation positives, 12 réactions négatives).

### III. — Recherche des substances immunisantes dans l'urine des malades atteints de la maladie de Weil.

Le sérum sanguin des convalescents de la maladie de Weil contient des substances qui, injectées à d'autres individus, peuvent avoir un effet préventif et thérapeutique. Nous avons fait les expériences suivantes pour voir si l'urine contient également de ces substances.

(1) Pouvoir anticomplémentaire faible du sérum.

a) Nous avons injecté par voie sous-cutanée, durant trois jours de suite et deux fois par jour, 1 cent. cube d'urine fraîche d'un convalescent à 5 souris adultes. L'urine injectée, qui agglutinait le *L. ictéro-hémorragique* jusqu'à 1 : 64, ne contenait pas de leptospires vivants (plusieurs cultures et injections chez le cobaye ne donnaient que des résultats négatifs). Après la sixième injection d'urine, nous injectons dans la cavité abdominale 1 cent. cube d'une culture virulente de *Lept. ictéro-hémorragique*. 5 autres souris furent traitées de la même manière, avec cette différence toutefois que l'urine injectée était préalablement chauffée à 100° durant une demi-heure pour détruire les anticorps qui pourraient être présents.

De chaque groupe 1 ou 2 souris furent tuées après dix-huit, cinquante-trois ou quatre-vingts jours.

4 souris du premier groupe ne présentaient pas de leptospires ni dans l'urine durant la vie, ni dans les organes après la mort. Chez la cinquième souris, qui fut tuée après quatre-vingts jours, nous avons pourtant trouvé des leptospires dans le rein.

Les 5 souris de contrôle du second groupe excrétaient des leptospires dans les urines dès la seconde semaine après l'infection, et dans les reins de toutes les 5 nous avons trouvé des leptospires.

b) Ensuite nous avons injecté l'urine d'un autre convalescent de la maladie de Weil à des cobayes. Cette urine agglutinait le *L. ictéro-hémorragique* jusqu'à 1 : 128 et elle ne contenait pas de leptospires vivants (contrôles par culture et par injection chez des cobayes jeunes).

3 cobayes adultes (n°s 1, 2 et 3) ont reçu, par voie sous-cutanée, durant trois jours, trois fois par jour, 5 cent. cubes d'urine fraîche obtenue par cathétérisme.

Chez un deuxième groupe de 3 cobayes (n°s 4, 5 et 6) les mêmes injections furent faites avec de l'urine chauffée à 100°.

Immédiatement après la dernière injection, les 6 cobayes furent infectés avec une culture virulente du *L. ictéro-hémorragique* du rat (qui nous a été aimablement remise par M. le professeur Schüffner). Cette culture fut frottée sur la peau scarifiée des cobayes n°s 1 et 4, tandis que 0 c. c. 1 de la culture fut injecté dans la cavité abdominale des cobayes n°s 2 et 5 et 0 c. c. 9 par la même voie chez les cobayes n°s 3 et 6.

Le cobaye n° 2 mourut après huit jours par suite d'une inflammation purulente diffuse du tissu sous-cutané du ventre où les urines avaient été injectées. Nous n'avons pas réussi à démontrer la présence de leptospires ni microscopiquement, ni par la culture, dans l'urine, dans le foie ou dans les reins de ce cobaye.

Les deux cobayes restant de ce groupe (n°s 1 et 3) n'ont jamais montré de signes d'infection. Ils ont été tués après treize jours. Le sérum sanguin ne contenait aucune trace d'agglutinine. Dans les organes et dans l'urine du cobaye n° 3 nous n'avons pas réussi à déceler de leptospires au moyen des cultures. Cependant, les cultures du rein et du foie du cobaye n° 1 ont donné un résultat positif après huit jours de culture dans le milieu de Korthof.

Les 3 cobayes de contrôle paraissaient infectés. Les cobayes n°s 4 et 5 moururent le neuvième jour après l'infection en montrant à l'autopsie l'image classique de la maladie de Weil (coloration jaune intensive du cadavre, hémorragies dans les organes, etc.). Nous avons cultivé le leptospire du foie et des reins. Le cobaye n° 6, qui avait été injecté avec 0 c. c. 9 de culture, resta vivant plus longtemps. Ce cobaye fut tué en même temps



que les cobayes du premier groupe (nos 1 et 3). Tandis que ceux-ci ne montraient aucun signe d'infection à l'autopsie, le tissu sous-cutané et la graisse du cobaye n° 6 avaient une couleur jaune caractéristique que l'on observe dans une infection par le *L. ictéro-hémorragique*. Dans les poumons on observa de nombreuses hémorragies. En outre, le sérum sanguin de ce cobaye agglutina le *L. ictéro-hémorragique* jusqu'à une dilution de 1 : 320. Nous avons obtenu des reins et du foie une culture bien développée de leptospires après quatre jours.

On peut déduire de ces expériences que l'urine des malades contient une substance qui a empêché l'infection de l'organisme par les leptospires chez 4 sur 5 souris et chez 2 sur 3 cobayes injectés.

#### IV

Il est intéressant, au point de vue biologique, de savoir s'il faut, pour que l'excrétion d'agglutinines dans les urines se produise, que l'individu ait été malade préalablement ou s'il suffit que les anticorps se trouvent dans le sérum pour qu'ils puissent apparaître dans les urines.

Des expériences effectuées sur des lapins auxquels nous avons injecté du sérum agglutinant à titre très fort, dans le but d'obtenir des agglutinines dans l'urine, n'ont rien donné. De même les injections préalables de sublimé qui entraînent des lésions rénales chez des lapins immunisés passivement sont restées sans résultat.

Nous avons réussi des expériences d'immunisation active sur 3 chiens.

CHIEN N° 1. — Agé d'un an, reçoit 6 fois par voie intrapéritonéale, sous-cutanée ou intraveineuse, une suspension de *L. canicola* préalablement chauffée à 56°. dans le but de tuer les leptospires, sans que les antigènes soient détruits. L'urine est contrôlée tous les jours. Après ces injections, on voit apparaître dans le sang des agglutinines dont les titres varient entre 1/800 et 1/3.200. Les examens d'urine furent faits durant quatre-vingt-dix-sept jours. Cependant nous ne sommes jamais parvenus à déceler des agglutinines dans les urines.

CHIEN N° 2. — Agé de deux ans environ, reçoit par voie intra-abdominale 1 cent. cube d'une culture de *L. ictéro-hémorragique*, préalablement tuée par 1 2 p. 100 de formol et cinq jours après une injection intraveineuse de 5 cent. cubes de la même suspension. Six jours plus tard le sérum sanguin agglutine le leptospire jusqu'à 1/800, après douze jours le titre a monté jusqu'à 1 3.200. Cependant dans les urines, qui ont été contrôlées presque journal-

lement pendant trois mois, nous n'avons jamais pu déceler une trace d'agglutinine.

CHIEN n° 3. — Agé d'un an, reçoit 1 fois par voie intrapéritonéale une injection de *L. canicola* vivants. L'animal réagit par de la fièvre durant quelques jours et une conjonctivite. Une semaine après l'animal est guéri. Les titres d'agglutination dans le sérum montaient à 3.200-6.400.

On voit apparaître des agglutinines dans l'urine six jours après l'injection. D'abord le titre varie entre 0 et 8, mais il reste positif à partir du quinzième jour (titre 250-2.000). L'urine agglutine encore après huit mois lorsqu'elle est diluée à 1/1.000.

Il résulte donc de ces expériences que la présence d'agglutinines dans le sérum ne suffit pas seulement pour assurer l'excrétion d'agglutinines dans les urines. Probablement, pour que l'individu présente des agglutinines dans les urines, il faut une *infection*.

## V

La présence d'anticorps spécifiques dans les urines nous a donné la possibilité d'étudier plus exactement les propriétés de ces substances, qui n'ont été rencontrées jusqu'ici que dans un milieu riche en albumines. Nous nous sommes occupé de cette étude et nous avons observé que réellement il y a des différences entre les propriétés des agglutinines du sérum sanguin et celles de l'urine. Voici quelques exemples :

Le sérum d'un malade atteint de la maladie de Weil (homme, chien) passé par un filtre EK de Seitz, contient des anticorps aussi bien que le sérum non filtré. Au contraire, les urines qui agglutinent les leptospires ont perdu complètement leurs agglutinines après cette filtration (pression de 20 centimètres Hg, filtration pendant deux à cinq minutes).

Par conséquent ces substances de l'urine sont retenues par le filtre EK, mais elles traversent ce filtre quand elles se trouvent dans le sérum. Il ne s'agit pas ici de la *quantité* des anticorps (les urines à un titre de 1/1.000 ne contiennent pas d'agglutinines après la filtration tandis que les sérums dilués jusqu'à un titre final de 1/50 ou de 1/100 gardent leur titre après le passage sur le filtre).

On peut également absorber les agglutinines de l'urine par agitation avec le charbon animal ou avec du *bolus alba* (kaolin).

Cette opération n'a aucune influence sur les agglutinines qui se trouvent dans le sérum sanguin; les sérums gardent leur pouvoir agglutinant.

On peut démontrer que la filtrabilité des agglutinines tient à la présence d'albumines :

1° Quand on ajoute à l'urine contenant les agglutinines une quantité égale d'un sérum sanguin quelconque, d'une solution d'albumine d'œuf séchée (7 p. 100) ou d'une solution d'albumine d'œuf frais (10 p. 100), du liquide d'ascite ou bien de la gélatine (1 p. 100), on observe que les agglutinines passent quantitativement par le filtre.

2° Quand on ajoute du sérum, de la gélatine, etc., à une urine agglutinante, les anticorps ne sont plus adsorbés par agitation avec le charbon animal ou le *bolus alba* (kaolinum).

3° Les agglutinines provenant de l'urine et adsorbées par le filtre EK, y peuvent être libérées par le passage d'une albumine (par exemple on peut éluer les agglutinines adsorbées de 20 cent. cubes d'urine, par une filtration consécutive de 2 cent. cubes de sérum ou des albumines indiquées plus haut).

4° On peut également absorber les agglutinines adsorbées de l'urine par le charbon animal ou par le *bolus alba* par une agitation avec du sérum, de la gélatine, etc.

Tandis que nous n'avons pu constater aucune influence de la concentration des ions-hydrogène sur la filtrabilité des agglutinines dans l'urine, le pH est un facteur important dans un milieu albumineux. Nous avons étudié la filtrabilité des agglutinines dans l'urine mélangée de gélatine (on doit tenir compte du fait que le passage par le filtre EK produit une augmentation considérable du pH dans le liquide filtré). Tandis que les anticorps dans ce mélange sont filtrables à un pH d'environ 5 ou plus, ils sont adsorbés par le filtre quand le pH descend jusqu'à 4, 5 environ.

(Probablement ce phénomène doit être rattaché au point iso-électrique qui, en ce qui concerne la gélatine se trouve à pH 4,7.)

Ces exemples montrent que la présence dans l'urine des agglutinines des leptospires permet de faire une étude plus exacte de ces anticorps.



### Conclusions.

Dans les cas de spirochétose chez l'homme, chez le chien et chez le rat sauvage, les urines contiennent presque toujours des agglutinines et souvent aussi des lysines spécifiques pour le type de leptospire en cause (*L. ictéro-hémorragique* ou *L. canicola*).

L'examen des urines chez l'homme non infecté ne révèle pas d'anticorps spécifiques.

Les agglutinines peuvent encore être décelables dans les urines très longtemps après la guérison complète. L'agglutination par les urines s'établit quelques jours plus tard que par le sang.

Ces réactions des urines peuvent être utilisées pour faire le diagnostic de la maladie de Weil ou pour des recherches épidémiologiques et rétrospectives.

Dans l'urine des individus atteints de la maladie de Weil, on peut trouver en outre des corps immunisants capables d'empêcher l'infection chez les souris et chez les cobayes et de temps en temps des ambocepteurs spécifiques.

D'après les recherches expérimentales, il est probable que l'excrétion des agglutinines dans l'urine ne se produit qu'après une infection par le leptospire. Par des injections de leptospires tués, on voit apparaître des agglutinines dans le sérum, mais non dans l'urine.

La présence des agglutinines dans l'urine (ne contenant pas d'albumines) nous permet de les étudier plus exactement.

Je tiens à remercier M. le Dr H. W. Høesen à Rotterdam et M. le Professeur A. Klarenbeek à Utrecht, d'avoir bien voulu me remettre du matériel des divers cas de leptospiroses de l'homme et du chien, qui ont fait l'objet de cette étude.

### ERRATA

Article de R. Chaussinand (ces *Annales*, 55, octobre 1935, p. 451), lire :

Page 454, 26<sup>e</sup> ligne, de 0 milligr. 003 à 0 milligr. 3, au lieu de 0 milligr. 003.

Page 466, 35<sup>e</sup> ligne, 3 p. 100, au lieu de 30 p. 100.

Page 470, 5<sup>e</sup> ligne, prémunition des enfants de milieu tuberculeux, au lieu de prémunition des enfants tuberculeux.

Le Gérant : G. MASSON.



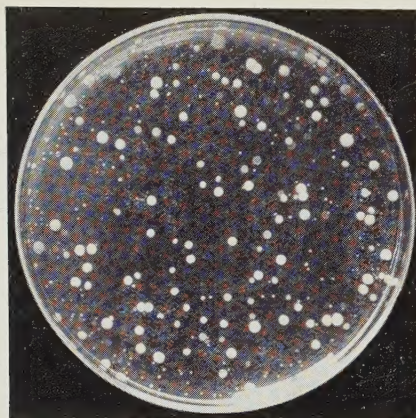


FIG. 4 a.

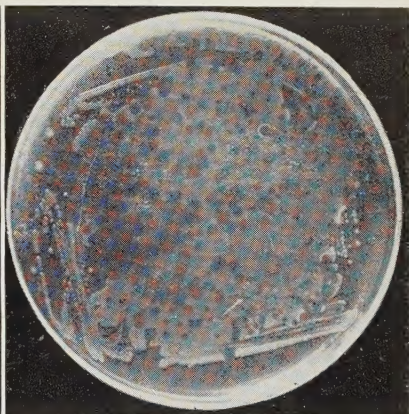


FIG. 4 b.

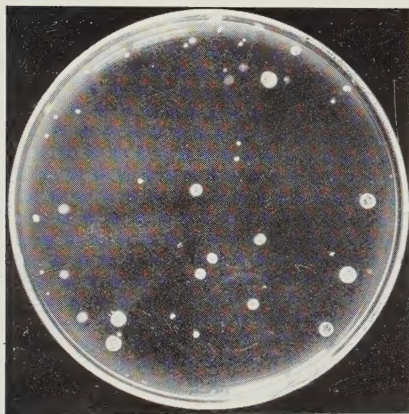


FIG. 5 a.

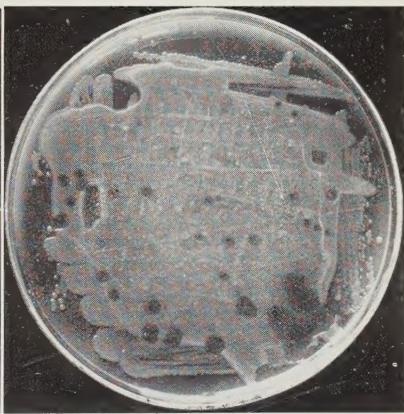


FIG. 5 b.

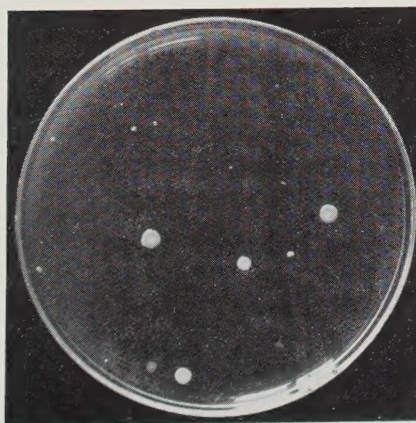


FIG. 6 a.

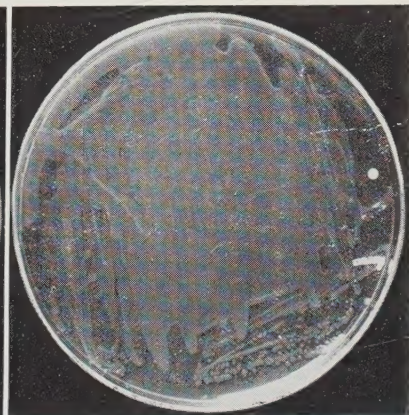


FIG. 6 b.

